

Hydrogele auf der Basis von Hydroxyethylstärke als Drug Delivery Systeme für die
kontrollierte Freisetzung von Proteinen

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo- Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Kristin Scheibe
aus Halberstadt

1. Referent: Professor Dr. Rolf Daniels
2. Referent: Professor Dr. Henning Menzel
Eingereicht am: 27.09.2007
Mündliche Prüfung (Disputation) am: 03.03.2008
Druckjahr 2008

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Scheibe, K., Daniels, R.: A new aqueous two phase system based on Hydroxyethylstarch and Polyethylenglycol (Poster) Proc. Annual Meeting of the Controlled Release Society Local Chapter Germany, München (2003).

Scheibe, K., Menzel, H., Daniels, R.: A polymerisable Hydroxyethylstarch derivative for the preparation of new hydrogel systems. (Poster) Proc. DPhG Annual Congress, Würzburg (2003).

Scheibe, K., Daniels, R.: Characterisation of an aqueous two- phase system based on Hydroxyethylstarch and Polyethylenglycol (Poster) Proc. International Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Nuernberg, (15-18 March 2004).

Scheibe, K., Daniels, R.: Factors to influence the protein separation in aqueous two-phase systemsbased on hydroxyethylstarch and poly(ethylenglycol) (Poster) 19th European Conference on Biomaterials, Sorrento – Italy (September 11-15, 2005).

“None will ever be a true Parisian who has not learnt to wear a mask of gaiety over his sorrows and one of sadness, boredom or indifference over his inward joy.”

Gaston Leroux

Für alle, die mich unterstützt haben!

Danke.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. R. Daniels am Institut für Pharmazeutische Technologie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.

Herrn Prof. Dr. Rolf Daniels

danke ich für die Vielzahl an interessanten Themen aus denen ich diese Arbeit wählen konnte und für die große Freiheit mit der ich eigene Ideen verfolgen konnte.

Herrn Prof. Dr. Hennig Menzel danke ich für die freundliche Aufnahme im Institut für makromolekulare Chemie für die Durchführung der Synthesen und für die Anfertigung des Zweitgutachtens.

Ich bedanke mich recht herzlich bei allen technischen und wissenschaftlichen Mitarbeitern der chemischen, biologischen und pharmazeutischen Institute für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit und Unterstützung, sowie für die fachlichen Anregungen, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Dabei möchte ich mich besonders möchte ich mich dabei bei Frau Dagmar Hahne und Frau Antje Bieder für Ihre herzliche Unterstützung bedanken. Frau Karin Becker danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der Proteinnachweise.

Dem Sonderforschungsbereich SFB 578 danke ich für die Aufnahme als Teilprojekt und die damit erfolgte finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Weiterhin danke ich:

Herrn Dr. Haberzettl für die fachliche Durchsicht des Manuskripts und Frau A. Haberzettl für Ihr Verständnis und die persönliche Unterstützung.

Frau Bettina Borchert danke ich für die kritische Durchsicht des Manuskript und die große Unterstützung bei der sprachlichen Überarbeitung.

Abschließend danke ich Pierre Borchert für die Geduld und den liebevollen Druck der zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen hat.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	6
1. EINLEITUNG	9
2. ALLGEMEINER TEIL	12
2.1. WÄSSRIGE ZWEPHASENSYSTEME FÜR DIE HERSTELLUNG VON MIKROPARTIKELN	12
2.1.1 WASSER UND SEINE EIGENSCHAFTEN IM BEZUG AUF ZWEPHASENSYSTEME	14
2.1.2 HYDRATATION VON PROTEINEN UND DENATURIERUNG	16
2.1.3 PROTEIN- SALZ WECHSELWIRKUNGEN UND DIE HOFMEISTER-SERIE	19
2.1.4 POLYMER-POLYMER, PROTEIN-POLYMER UND SALZ- POLYMER INTERAKTIONEN IN WÄSSRIGER LÖSUNG	23
2.2. HYDROGELE ALS SYSTEME FÜR DIE FREISETZUNG VON PROTEINEN	24
2.3. WÄSSRIGE ZWEPHASENSYSTEME FÜR DIE HERSTELLUNG VON PROTEINBELADENEN DRUG DELIVERY SYSTEMEN	27
3. MATERIAL UND METHODEN	31
3.1. MATERIALIEN	31
3.1.1 HYDROXYETHYLSTÄRKE (HES)	31
3.1.2 POLYETHYLENGLYCOL (PEG)	33
3.1.3 HEW-LYSOZYM	33
3.1.4 BONE MORPHOGENETIC PROTEIN-2	34
3.1.5 REAGENZIEN, SUBSTANZEN, LÖSEMittel	35
3.2. METHODEN UND GERÄTE	37
3.2.1 CHARAKTERISIERUNG EINES NEUEN WÄSSRIGEN ZWEPHASENSYSTEMEN AUS HES UND PEG	38
3.2.1.1 Wässriges Zweiphasensystem aus HES und PEG	38
3.2.1.2 Bestimmung der Phasenseparationszeit	38
3.2.1.3 Analyse der Phasenmengenverhältnisse	41
3.2.1.4 Bestimmung des Wassergehaltes der separierten Einzelphasen	42
3.2.1.5 Bestimmung der Konodenlage	42
3.2.2 KAPILLARVISKOSIMETRIE	44

3.2.3	UNTERSUCHUNG DES PHASENSEPARATIONSVERHALTENS VON PROTEINEN IM ZWEIPHASENSYSTEM	49
3.2.3.1	Bestimmung des Lysozymgehaltes im Zweiphasensystem	49
3.2.3.2	Ermittlung des BMP-2 Gehaltes im Zweiphasensystem	49
3.2.3.3	Untersuchung des Phasenseparationsverhalten von Proteinen bei unterschiedlichen pH- Werten und unter Verwendung von verschiedenen Puffersystemen	50
3.2.3.4	Separationsverhalten der verwendeten Puffersalze im Zweiphasensystem in Abhängigkeit von der Salzkonzentration und dem pH-Wert	52
3.2.4	SYNTHESE EINER POLYMERISIERBAREN HYDROXYETHYLSTÄRKE (HES) UND DEREN CHARAKTERISIERUNG	53
3.2.4.1	Berechnungen für die Synthese von mit Hydroxyethylmethacrylat verknüpfter Hydroxyethylstärke (HES-HEMA)	53
3.2.4.2	Synthese von HES-HEMA	55
3.2.4.3	Analytik der Synthesezwischenstufen und des Endprodukts	56
3.2.5	HERSTELLUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON NEU ENTWICKELTEN HYDROGELMIKROPARTIKELN AUF BASIS VON HES-HEMA	58
3.2.5.1	Photopolymerisation der neu entwickelten Hydroxyethylstärke- hydroxyethylmethacrylatderivates zu Mikropartikeln	59
3.2.5.2	Mikroskopische und Elektronenmikroskopische Untersuchung der Mikropartikel	61
3.2.5.3	Partikelgrößenbestimmung der Hydrogelmikropartikel	62
3.2.5.3.1	Laserdiffraktometrie	62
3.2.5.3.1	Mikroskopische Bestimmung der Partikelgrößenverteilung	62
3.2.5.4	Zytotoxizitätstest der Polymersiationsmischungen und des Polymerisationsproduktes	63
3.2.6	FREISETZUNGSUNTERSUCHUNGEN AN PROTEINBELADENEN HYDROGEL-MIKROPARTIKELN	64
3.2.6.1	Untersuchung der Membrandurchlässigkeit von Dialysemembranen für die Anwendung in Freisetzungsuntersuchungen	64
3.2.6.2	Freisetzungsuntersuchung an Lysozym beladenen Mikropartikeln	65
3.2.6.3	Lysozymanalytik für die Freisetzungsuntersuchungen	65
3.2.6.3.1	Lysozymnachweis mit Elektrophorese und Coomassieblaufärbung	65
3.2.6.3.2	Lysozymanalytik mittels ELISA-Test	67

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION **69**

4.1	WÄSSRIGE ZWEIPHASENSYSTEME AUS PEG UND HES	69
4.1.1	ZWEIPHASENSYSTEME AUS PEG UND HES	69
4.1.2	PHYSIKOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG DES ZWEIPHASENSYSTEMS AUS HES UND PEG	73
4.1.2.1	Phasenseparationszeiten und Phasenmengenverhältnisse im Zusammenhang mit dem Wassergehalt der Einzelphasen	74

4.1.2.2	Konodenlage verschiedener PEG/ HES Zweiphasensysteme	81
4.1.3	UNTERSUCHUNG DER LÖSUNGSSTRUKTUREN VON HES UND PEG	86
4.1.4	UNTERSUCHUNG DES PHASENSEPARATIONSVERHALTEN VON PROTEINEN UND SALZEN IN ZWEIPHASENSYSTEMEN AUS HYDROXYETHYLSTÄRKE, POLYETHYLENGLYKOL UND WASSER	90
4.1.4.1	Separationsverhalten von Lysozym im wässrigen Zweiphasensystem aus HES und PEG und der Einfluss von Salzzusätzen	90
4.1.4.2	Separationsverhalten von Bone-morphogenetic-Protein-2	95
4.1.5	EINFLUSS VON SALZEN AUF DAS WÄSSRIGE ZWEIPHASENSYSTEM	97
4.1.6	ZUSAMMENFASSUNG DER CHARAKTERISIERUNG WÄSSRIGER ZWEIPHASENSYSTEME UNTER BERÜCKSICHTIGUNG DES PHASENSEPARATIONSVERHALTENS VON PROTEINEN	105
4.2	SYNTHESE UND CHARAKTERISIERUNG EINER POLYMERISIERBAREN HYDROXYETHYLSTÄRKE	107
4.2.1	ENTWICKLUNG EINES POLYMERISIERBAREN HYDROXYETHYLSTÄRKEDERIVATES	107
4.2.2	ERGEBNISSE DER SYNTHESE EINER POLYMERISIERBAREN HES-HEMA	113
4.3	NEUE METHODEN ZUR HERSTELLUNG VON MIKROPARTIKELN	113
4.3.1	PHOTOPOLYMERISATIONSPROZESSE ZUR HERSTELLUNG VON MIKROPARTIKELN IN WÄSSRIGEN ZWEIPHASENSYSTEMEN UND DEREN OPTIMIERUNG	114
4.3.2	CHARAKTERISIERUNG DER PARTIKEL UNTER BERÜCKSICHTIGUNG DES EINFLUSSES DER VERWENDETEN HERSTELLUNGSPARAMETER	118
4.3.3	ZYTOTOXIZITÄTSTEST	126
4.3.4	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE FÜR DIE NEU ENTWICKELTEN HES-HEMA- MIKROPARTIKEL	127
4.4	FREISETZUNGSUNTERSUCHUNGEN VON LYSOZYM AUS DEN ENTWICKELTEN MIKROPARTIKELN	128
4.4.1	ENTWICKLUNG EINES GEEIGNETEN IN VITRO-VERFAHRENS ZUM FREISETZUNGSVERHALTEN DER HYDROXYETHYLSTÄRKEMI-KROPARTIKEL	128
4.4.2	FREISETZUNGSVERHALTEN VON HYDROXYETHYLSTÄRKEMI-KROPARTIKELN	130
4.5	FAZIT	132
5.	ZUSAMMENFASSUNG	135
6.	LITERATURVERZEICHNIS	137

1. Einleitung

Die Entwicklung von arzneilich verwendbaren Proteinen für die verschiedensten Krankheitsbilder hat in den letzten Jahren erheblich an Bedeutung gewonnen. Für einen Großteil der mit Proteinen behandelbaren Erkrankungen ist die Entwicklung von geeigneten Darreichungsformen notwendig. Viele Proteine lassen sich nicht wie klassische Arzneistoffe peroral applizieren, da sie im Organismus sehr schnell Denaturierungs- und Abbauprozessen unterliegen. Aus diesem Grund sind viele Proteine häufig nur auf parenteralem Weg verabreichbar. Nach der parenteralen Gabe unterliegen die Proteine einem zügigen Abbau durch körpereigene Proteasen im Organismus.

Um den Verlust von arzneilich wirksamem Protein vorzubeugen, ist es von Vorteil eine systemisch applizierbare Arzneiform zu entwickeln, welche eine kontrollierte Freisetzung des Proteins im Rahmen der Therapie ermöglicht. Für bestimmte Proteinwirkstoffe ist die direkte Verabreichung einer retardierten Arzneiform an den Wirkort wünschenswert. Dadurch können geringere Mengen an Protein eingesetzt werden und das Risiko unerwünschter Arzneimittelwirkungen reduziert werden, da weniger Wechselwirkungen des Stoffes mit anderen Organen möglich sind. Zum Erreichen einer guten Compliance beim Patienten, ist die Entwicklung einer Arzneiform anzustreben, welche eine verzögerte Freisetzung des Arzneistoffes entsprechend dem Therapiefenster gewährleistet. Dabei sollte der angestrebte Retardierungseffekt nur wenige Gaben des Wirkstoffs notwendig machen.

Die Arbeit mit der Stoffgruppe der Proteine stellt erhöhte Ansprüche an die Verarbeitung. Schon kleinste Abweichungen vom ursprünglichen physiologischen System können Wirkbeeinträchtigungen zur Folge haben. Die Produktion arzneilich verwendbarer Proteine ist ein sehr aufwendiger und kostenintensiver Prozess, so dass es sinnvoll erscheint für die weitere Verarbeitung und die Entwicklung von Arzneiformen, Methoden zu entwickeln und Stoffe zu verwenden, welche möglichst keine denaturierenden oder inaktivierende Effekte auf die Proteine haben.

Entsprechend den Eingangs beschriebenen Anforderungen für die Entwicklung einer parenteral und lokal verabreichbaren, sowie kontrolliert freisetzenden Arzneiform wurden Mikropartikel als optimale Formulierung für die Freisetzung von Proteinen ausgewählt. Durch ihre Größe im Mikrometerbereich lassen Sie sich gut an entsprechende Wirkorte als Depot applizieren. Dabei können die Art der Proteinbeladung und der strukturelle Aufbau der Arzneiform die Freisetzung von inkorporierten Wirkstoffen stark beeinflussen.

Für die arzneiliche Verwendbarkeit der zu entwickelnden Formulierung ist es notwendig Substanzen zu verwenden, die eine Herstellung von biokompatiblen, physiologisch unbedenklichen und biologisch abbaubaren Mikropartikeln möglich macht.

Für die Herstellung von Mikropartikeln im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode verwendet und überarbeitet, die in rein wässrigen Systemen abläuft. Dabei beruht diese Methode auf dem Phänomen, dass beim Mischen von zwei in Wasser löslichen Polymeren ein Zweiphasensystem entstehen kann [1]. Wird ein solches Zweiphasensystem gemischt entsteht eine Wasser- in- Wasser Emulsion mit einer kontinuierlichen und einer dispersen Phase [2]. Besitzt das gelöste Polymer in der dispersen Phase polymerisierbare Strukturen [3-6], so kann durch einen Polymerisationsschritt die Wasser in Wasseremulsion zur Herstellung von Mikropartikeln verwendet werden [7].

Für die Arbeit mit wässrigen Zweiphasensystemen ist die Verwendung von wasserlöslichen Substanzen notwendig. Für die Auswahl geeigneter Ausgangsstoffe wurde die Stoffgruppe der Hydrogelbildner näher betrachtet. Die Hydrogelbildner haben den Vorteil, dass viele Substanzen dieser Stoffgruppe eine gute Biokompatibilität besitzen und aufgrund ihrer hydrophilen Oberfläche kaum destabilisierende Wechselwirkungen mit Proteinen zeigen [8, 9]. Unter diesen Polymeren finden sich Moleküle, welche seit langem als Plasmaexpander verwendet werden und eine gut dokumentierte physiologische Unbedenklichkeit besitzen. Aus dieser Gruppe der hydrogelbildenden Plasmaexpander wurde für diese Arbeit Hydroxyethylstärke (HES) gewählt [10]. Es handelt sich dabei um ein Makromolekül, welches durch Hydrolyse, Hydroxyethylierung und Ultrafiltration aus Wachsmaisstärke gewonnen wird [11]. Wachsmaisstärke besteht zu 95 % aus Amylopektin, ein Polysaccharid mit α -1,4-glycosidischen Bindungen in den unverzweigten Kettenabschnitten und mit Verzweigungen in α -1,6-Position, welches strukturelle Ähnlichkeit zum menschlichen Speicherprotein Glykogen hat [11]. Durch die Verzweigungen im Molekül der Hydroxyethylstärke erscheint sie als besonders geeignet für die Entwicklung einer retardiert freisetzenden Arzneiform.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Hydroxyethylstärke in der Lage ist, wässrige Zweiphasensysteme zu bilden, und damit die Möglichkeit besteht, sie für die Herstellung von proteinbeladenen Mikropartikeln zu verwenden. Dabei wurden Hydroxyethylstärken mit unterschiedlichen Kettenlängen und variierenden Substitutionsgraden getestet. Gleichzeitig erfolgten Untersuchungen zur Ermittlung der Einflussfaktoren auf die Zweiphasensystembildung. In diesem Zusammenhang wurden auch Charakteristika der Zweiphasenbildung bei der Verwendung von Hydroxyethylstärken analysiert.

Im Bezug auf die Entwicklung von proteinbeladenen Hydrogelmikropartikeln war es notwendig das Verhalten von Proteinen in Zweiphasensystemen zu ermitteln. Durch Kenntnis der Einflussfaktoren auf das Proteinverhalten ist dann eine Steuerung der Proteinanreicherung im Zweiphasensystem denkbar.

Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit ein polymerisierbares Derivat der Hydroxyethylstärke entwickelt. Hierbei ist eine polymerisierbare Struktur von entscheidender

Bedeutung für die Bildung von chemisch vernetzten Mikropartikeln [3, 12, 13]. Durch die Art der Vernetzung kann die Freisetzung von Arzneistoffen gesteuert werden. Darauf aufbauend sollte anschließend ein geeignetes Verfahren zur Polymerisation des Hydroxyethylstärkederivates zu Mikropartikeln entwickelt werden. Dabei erfolgte neben der Verfahrensentwicklung und Optimierung auch die Charakterisierung der erhaltenen Produkte. Ein weiterer Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Analyse der Freisetzungseigenschaften von Proteinen aus den neu entwickelten Mikropartikeln.

Diese Arbeit gibt einen Überblick über die Entwicklung einer Hydrogelformulierung aus Hydroxyethylstärke für die kontrollierte Freisetzung von Proteinen.

2. Allgemeiner Teil

2.1. Wässrige Zweiphasensysteme für die Herstellung von Mikropartikeln

Beim Mischen zweier wässriger Polymerlösungen kann ein System entstehen, welches in zwei getrennte Phasen separiert. Bereits im Jahre 1896 wurde von Beijerinck die Inkompatibilität bestimmter Polymere in wässriger Lösung beschrieben. In dem von Ihm beschriebenen Fall handelte es sich um ein zweiphasiges System aus Agar und löslicher Stärke, sowie aus Agar und Gelatine [1]. Seither wurden eine Reihe weiterer Polymerkombinationen gefunden, aus deren Mischung Zweiphasensysteme resultieren (siehe Tab. 1). Eines der bestuntersuchtesten Systeme ist dabei das Polyethylenglykol (PEG) / Dextran System [1].

Polymer	Polymer	Literaturhinweis
Propylenglycol	Polyethylenglycol	Albertsson (1958)
	Polyvinylalkohol	
	Polyvinylpyrrolidone	
	Hydroxypropyldextran	Albertsson (1958)
	Dextran	Albertsson (1958)
Polyethylenglycol	Polyvinylalkohol	Albertsson (1958)
	Polyvinylpyrrolidon	Albertsson (1958)
	Dextran	Albertsson (1958)
	Hydroxypropylstärke	Venancio, Teixeira (1993)
	Hydroxyethylstärke	Scheibe (2001)
Polyvinylalkohol	Methylcellulose	Dobry (1938)
	Hydroxypropyldextran	Albertsson (1958)
	Dextran	
Methylcellulose	Hydroxypropyldextran	Albertsson (1958)
	Dextran	

Tab. 1: wässrige Zweiphasensysteme auf der Basis von Polymer-Polymer-Wasser Systemen aus [7]

Es werden nicht ionische und ionische Polymere für die Herstellung von wässrigen Zweiphasensystemen beschrieben. Dabei können Systeme entstehen, welche beide Polymere überwiegend in einer Phase aufweisen oder Systeme, in dem sich in den beiden Phasen überwiegend eines der beiden Polymere anreichert [1]. Entstehen Systeme mit nur einer polymerreichen Phase, nennt man diese Art der Separation Komplexkoazervation [7]. Bilden sich zwei Phasen, in denen jeweils eines der beiden Polymere überwiegt, so wird die Phasenseparation als Inkompatibilität zwischen den beiden Phasen verstanden [14]. Ist die

Separation in zwei Phasen die Folge der Verdrängung eines in einem Lösungsmittel gelösten Polymers durch niedermolekulare Stoffe wie z.B. Salze so spricht man von einfacher Koazervation.

Für die Ausbildung von zwei- oder mehrphasigen Systemen in Wasser werden unterschiedliche Ursachen diskutiert. Um sich dieses Phänomens anzunehmen, können verschiedene Ansätze herangezogen werden wie z.B. die thermodynamischen Eigenschaften von Polymeren in Lösung [15, 16]. Das Ergebnis des Mischens von zwei Substanzen ist abhängig von der Entropie der Mischung und den Wechselwirkungen zwischen den Molekülen [14]. Dabei verstärken sich die Interaktionen zwischen den Molekülen mit zunehmender Molekülgröße und mit zunehmender Ausdehnung in Lösung [17, 18]. Wird das Molekül sehr groß, überwiegen meistens die Wechselwirkungen zwischen den Molekülsegmenten gegenüber dem Entropiegewinn durch das Mischen. Handelt es sich bei den Wechselwirkungen zwischen Polymersegmenten unterschiedlicher Moleküle überwiegend um Abstoßung, d.h. die Moleküle sind lieber umgeben von ihresgleichen, dann wird der energetisch günstigste Zustand die Separation in zwei Einzelphasen sein [19]. Dabei hat das Lösungsmittel als Hintergrundmedium einen indirekten Einfluss auf die effektiven Wechselwirkungen zwischen den Polymeren.

In neueren Veröffentlichungen betrachtet man dabei den Abstoßungseffekt zwischen gelösten Polymeren als Ergebnis einer Steigerung des osmotischen Druckes bei der Annäherung von zwei Makromolekülen unterschiedlicher Art [14, 20].

Andere Theorien beschreiben die wässrige Phasenseparation über die Eigenschaften der eingesetzten Polymere. Betrachtet man z.B. ein System mit Polyethylenglykol (PEG) und Dextran in Wasser, so wird man feststellen, dass das oft als etwas weniger hydrophil beschriebene PEG die obere Phase mit einer geringeren Dichte bildet [21]. Die Annahme, das PEG weniger hydrophil ist, beruht dabei auf Mikrowellen-Dielektrizitätsmessungen des umgebenen Wassers und auf den im PEG vorhandenen Methylen- und Ethergruppen [21]. Die Mikrowellenmessungen dazu zeigten, dass das PEG umgebene Wasser sehr geordnet ist, d.h. dass das PEG keinen großen strukturbrechenden Einfluss und damit auch keine starken Wechselwirkungen mit den Wassermoleküle eingeht [21]. Bei sehr hydrophilen Polymeren hingegen stellte man fest, dass sich das Wasser aufgrund der stärkeren Wechselwirkungen sehr ungeordnet verteilt [21]. Bedient man sich dieser Theorien, so kann man davon ausgehen, dass das Mischen eines wasserlöslichen Moleküls, welches starke Wechselwirkungen mit Wasser eingeht und eines weniger mit Wasser wechselwirkenden Moleküls in Abhängigkeit von der Konzentration zu einem wässrigen Zweiphasensystem führt.

Setzt man Polymer-Wasser-Mischungen ein weiteres Makromolekül zu, so können wiederum separierende Mehrphasensysteme oder homogene Mischungen resultieren. Das erhaltene

Ergebnis nach dem Mischen zweier oder mehrerer Makromoleküle ist dabei von einer Reihe verschiedenster Wechselwirkungen und energetischer Zustände abhängig.

Dabei werden die Phänomene der Phasenseparation zunehmend im Zusammenhang mit dem verwendeten Lösungsmittel Wasser betrachtet, welches die Analyse der Mehrphasensysteme noch komplexer gestaltet.

2.1.1 Wasser und seine Eigenschaften im Bezug auf Zweiphasensysteme

Wasser mit seinen vielen verschiedenen Eigenschaften und den bekannten Anomalien stellt ein sehr komplexes System dar. Zum Verständnis von wässrigen Zweiphasensystemen ist es daher unabdingbar sich mit der Struktur und den daraus resultierenden Eigenschaften von Wasser auseinander zu setzen. Dabei reicht es nicht mehr aus, Wasser als eine einfache Struktur, bestehend aus zwei Wasserstoffatomen verknüpft mit einem Sauerstoffatom, zu betrachten. Um die mannigfaltigen Eigenschaften des Wassers zu erläutern, muss man berücksichtigen, dass es sich bei Wasser um ein durch Wasserstoffbrücken gebildetes Netzwerk handelt, in welchem die Moleküle in einem Cluster geordnet vorliegen können [22].

Die Wasserstoffbrücken im Wasser weisen eine mittlere Stärke auf, so dass es kontinuierlich zum Wechsel zwischen Protonierung und Deprotonierung kommt [23]. Tritt ein weiterer Stoff in Wechselwirkung mit Wasserstoffatomen des Wassers können Strukturen entstehen, bei denen das Wasserstoffatom wie von beiden Substanzen gebunden reagiert [23]. Die beschriebenen Wasserstoffbrückenbindungen geht Wasser überwiegend mit sich selbst ein und bildet darüber so genannte Cluster. Kleinere Gruppen von vier Wassermolekülen bilden so genannte Bicyclooctamere [24]. Diese Bicyclooctamercluster können dann weitere Gruppierungen bilden. Dabei ist anzunehmen, dass die Struktur, welche das Wasser annimmt verwandt ist mit den Strukturen in hexagonalem oder kubischem Eis bei Atmosphärendruck [24]. Eine weitere, noch nicht isolierte Struktur von Eis bildet unterschiedliche boat- und chair- Formen, welche die Struktur von Blättern aus hexameren Wassergittern annehmen [24]. Diese Struktur ist möglicherweise dreidimensional gefaltet und würde dann ein icosahedrales Netzwerk bilden können, basierend auf der regulären Anordnung von tetrahedralen Einheiten basierend auf 14 Wassermolekülen [24]. Diese Cluster sind relativ stabil in flüssigem Wasser und bilden eine gekrümmte Oberfläche. Anordnungen von tetrahedralen Einheiten aus 14 Wassermolekülen bilden große icosahedrale Cluster [25]. Kleine Unterschiede in der geometrischen Struktur werden dabei von flexiblen Bindungen ausgeglichen [23]. Die Flexibilität wird gewährleistet über jede der vier tetrahedralen chair-Formen und ihre hexameren Flächen, welche über drei Wasserstoffbrücken mit den benachbarten Flächen verbunden sind [25]. Die gleiche icosahedrale Struktur kann auch erhalten werden, wenn eine Wassermischung aus

zyklischen Pentameren und trizyklischen Decameren als Grundstruktur vorausgesetzt wird [25]. Dabei sind diese drei vorausgesetzten Strukturen relativ stabil [24].

Es wird angenommen, dass das gebildete icosahedrale Netzwerk in der Lage ist zwei verschiedenen Formen an zu nehmen. Zum einen die geöffnete (expanded) Clusterstruktur mit entsprechend niedriger Dichte auch ES-Struktur genannt und andererseits die geschlossene (collapsed) oder kondensierte Clusterstruktur (CS) mit hoher Dichte, wobei beide Strukturen miteinander im Gleichgewicht stehen (siehe Abbildung 1) [24].

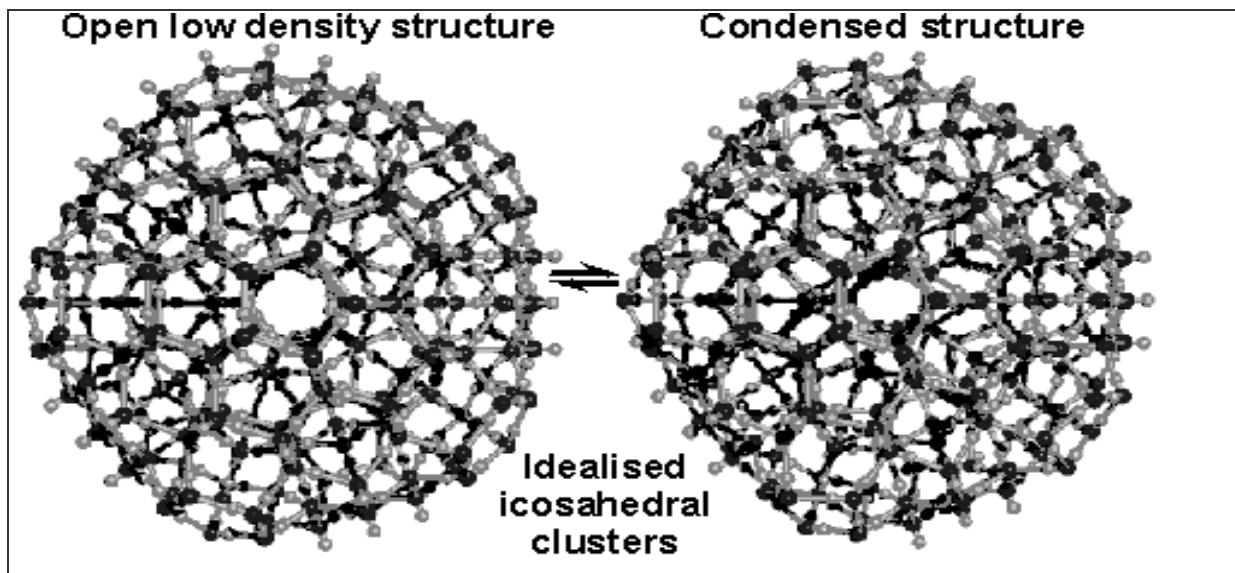


Abb. 1: Icosahedrale Wasserstruktur in der geöffneten (ES) und geschlossenen (CS) Struktur aus [15]

Die geöffnete und die geschlossene Struktur des Wassers stehen in reinem Wasser in einem Gleichgewicht [25]. Diese Gleichgewichtsprozesse laufen partiell im Netzwerk ab und sind von der Temperatur abhängig. Werden dem Wasser Stoffe hinzugefügt verschiebt sich das Gleichgewicht. Dabei bildet sich die geöffnete Wasserstruktur verstärkt aus in Gegenwart von starken Wasserstoffbindungen, welche begünstigt werden bei der Gegenwart von strukturierenden Stoffen [25]. Wenn die Wasserstoffbrücken schwächer werden, weil die Wechselwirkungen mit Fremdstoffen stärker sind bildet sich die geschlossene Clusterstruktur vermehrt aus [24].

Für flüssiges Wasser wurde die bewegliche, überlappende icosahedrale Netzwerkstruktur erstmals 1998 formuliert und unabhängig davon 2001 durch Röntgenbeugung an Wassernanotropfen bestätigt [24]. Dabei kann das Wasser durch Krümmen und Biegen der Wasserstoffbrücken unterschiedlich dichte Netzwerkstrukturen zeigen. Mit zunehmender Temperatur nimmt der Anteil an weniger dichten Strukturen (ES) zu. Mit Hilfe der icosahedralen Netzwerkstrukturen ist es möglich, Lösungs- und Hydratationseigenschaften von Ionen, hydrophoben und hydrophilen Makromolekülen, sowie auch die Anomalien des Wasser zu erklären [26].

2.1.2 Hydratation von Proteinen und Denaturierung

Ein Molekül oder eine Substanz kann in wässriger Lösung gelöst werden, wenn es in der Lage ist, die Wasserstruktur durch entsprechende Wechselwirkungen so zu verändern, dass Wassermoleküle Interaktionen mit diesen Substanzen aufnehmen. Wird ein Protein in Lösung gebracht, verändert sich seine dreidimensionale Struktur, d.h. die Wechselwirkungen zwischen Protein und Wasser verändern die Proteinfaltung, seine Stabilität und seine Dynamik [27]. Die sich ausbildende Proteinstruktur ist wichtig für die Aktivität und hängt ab von verschiedenen Kräften zwischen den Molekülen [27]. Zu diesen Kräften gehören Wechselwirkungen zwischen geladenen Gruppen, sowie van-der-Waalskräfte und Wasserstoffbrücken. Neben diesen Wechselwirkungskräften muss ebenfalls berücksichtigt werden, dass das zu lösende Protein das umgebende Lösungsmittel verändert und diese Veränderungen wieder auf das Protein rückwirken [27].

Die Löslichkeit von Proteinen in Wasser variiert sehr stark. Wird ein globuläres Protein in wässrige Lösung gebracht tritt das Molekül in Wechselwirkung mit Wasser und wird von einer Hydrathülle umgeben. Dabei hängt die Art und Stärke der Hydrathüllenbildung ab von den im Protein vorhandenen Aminosäuren [28]. Es gibt neben den globulären Proteinen, welche in Wasser oder verdünnten Salzlösungen löslich sind auch Proteine, welche unter physiologischen Bedingungen in Wasser unlöslich sind und Strukturproteine oder Skleroproteine genannt werden [28].

In Lösung sind Proteine in der Lage verschiedene Konformationen anzunehmen, welche im Gegensatz steht zu ihrer Struktur in wasserfreier Umgebung [29]. Als Ursache für diese Änderungen diskutiert man eine Reihe von unterschiedlichen Hydratationsformen. Dabei stehen die verschiedenen Hydratationsformen miteinander im Gleichgewicht und zeigen eine Abhängigkeit von der Wasseraktivität [29]. Es wird postuliert, dass stärker hydratisierte Proteinkonformationen reaktives Wasser bevorzugen. Dabei handelt es sich um Wasser höherer Dichte mit einer geschlossenen Struktur (CS-Struktur) (siehe Abschnitt 2.1.1) [24]. Hierbei kommt es durch die starken Wechselwirkungen mit Fremdstoffen zu einer vermehrten Bildung von schwachen, gebogenen oder gebrochenen Wasserstoffbrückenbindungen [25]. Weniger hydratisierte Proteinkonformationen gehen nicht so intensive Wechselwirkungen mit dem Wasser ein und die Bildung von offenen Wasserstrukturen (ES-Struktur) wird begünstigt [29]. Dieses Wasser besitzt eine niedrige Dichte [25].

Einen weiteren Einfluss auf die Proteinstruktur und deren Stabilität haben intramolekulare Wasserstoffbrücken. Diese Wasserstoffbrücken zeigen ihren größten Effekt in Abwesenheit von Wasser. Die Gegenwart von geringsten Mengen an Wassermolekülen verursacht eine Streckung der Wasserstoffbrücken im Proteinmolekül unter Auflockerung der Struktur [29]. Wassermoleküle können Brücken bilden zwischen dem Carbonylsauerstoff und den

Protonen von Amidstrukturen verschiedener Proteine, um damit verschiedene reversible Anordnungen zu katalysieren [28]. Die innermolekulare Anordnung von funktionellen Gruppen im Protein ist ausschlaggebend für die biologische Aktivität und ist abhängig vom Grad der Hydratation [28]. Das Wasser der Hydrathülle von Proteinen erlaubt deren Faltung und wird nur aus dem hydrophoberen Mittelkern vertrieben, wenn es durch zusammenwirkende Proteinketten-Wechselwirkungen herausgedrückt wird. Die Proteinfaltung erfolgt durch hydrophobe Wechselwirkungen [28]. Sie resultiert aus der energetisch ungünstigen Entropieabnahme, wenn eine große Oberflächenregion unpolarer Gruppen mit Wasser in Wechselwirkung treten kann. Dadurch sind die Wassermoleküle in direkter Nachbarschaft zu unpolaren Gruppen nicht in der Lage ihre Wasserstoffbrücken vollständig ausbilden zu können und es kommt zu strukturellen Zusammenbrüchen im Wassercluster [21].

Es wird weiterhin diskutiert, dass die unterschiedlichen Hydratationsgleichgewichte der Proteine mit Wasser hoher Dichte und der dazu postulierten geschlossenen (CS) Wasserstruktur oder mit Wasser niedriger Dichte und einer geöffneten (ES) Wasserstruktur ($ES \leftrightarrow CS$), Einfluss nehmend auf die Aktivität der Proteine sind [29]. So sorgt die Wasserstruktur für eine Balance zwischen Flexibilität (CS-Umfeld) und Festigkeit (ES-Umfeld) der Proteinstruktur [26].

Die erste Hydrathülle um ein Protein ist geordnet und es erfolgt dort ein hoher Protonentransfer [27]. Die hydratisierten Gebiete im Protein befinden sich sehr nah bei einander. Dabei schließen sich diese Gebiete gegenseitig aus. Es wurde diskutiert, dass die Solvation besser über eine Dichtefunktion beschrieben werden kann, als über spezifische vom Wasser belegte Gebiete [27].

Die Struktur von Proteinen ist gekennzeichnet durch eine variable Mischung von polaren und unpolaren funktionellen Gruppen. Wasser ordnet sich meistens um die polaren Gruppen und besitzt dort eine längere Aufenthaltszeit, als um unpolare Gruppen. Sowohl die polaren als auch die unpolaren Gruppen des Proteins verursachen im Wasser eine Strukturierung, wobei die Möglichkeiten der Strukturierung je nach funktioneller Gruppe unterschiedlich sind. Polare Gruppen sind in der Lage durch Wasserstoffbrücken, Dipol-Dipol- und ionische Wechselwirkungen geordnete Strukturen aufzubauen. Diese Art der Ordnung ist dabei energetisch bevorzugt. Das Wasser zeigt in Untersuchungen einem sehr langsamen Austausch der Wassermoleküle zwischen Hydrathülle und Bulkwasser [27]. Nicht polare Gruppen im Protein hingegen fördern die Bildung von Clathratstrukturen, welche bevorzugt von dichterem Wasser umgeben werden [29]. Daher ist es keine Überraschung, dass der Grad der Hydratisierung hydrophober Gruppen mit der Hydratation der polaren Gruppen im direkten Zusammenhang steht. Die beschriebenen Clathrathüllen enthalten dabei das Wasser in sehr beweglicher Form mit einer größeren Rotationsfreiheit als im Bulk [27].

Ganz allgemein betrachtet ist Wasser nicht nur notwendig für die korrekte Faltung von Proteinen sondern auch für die Aufrechterhaltung der Struktur- Kommt es zu einer Protein Denaturierung, so ist diese Reaktion häufig die Folge einer veränderten Hydratation der Proteinstruktur [30]. Dabei können die Vorgänge, welche zu eine Proteindenaturierung führen thermodynamisch beschrieben werden, wobei sowohl Enthalpie- als auch Entropieänderung dazu führen können, dass sich die freie Energie, welche durch die Temperatur beeinflusst wird, so ändert, dass das Protein sowohl in Wärme als auch in Kälte denaturiert. Die Änderung der freie Energie (ΔG_N^D) aus der Umwandlung der nativen (N) in die denaturierte (D) Proteinstruktur wird beschrieben über die Gibbs-Helmholtz-Gleichung:

$$\Delta G_N^D = \Delta H_N^D - T\Delta S_N^D \quad (1)$$

Die Änderung der freien Energie (ΔG_N^D) hängt dabei ab von kombinierten Effekten wie das Aufeinanderwirken von inneren polaren und unpolare Gruppen sowie ihre Wechselwirkungen mit Wasser und die resultierenden Änderungen in den Wasser-Wasser Wechselwirkungen. Ähnliche thermodynamische Veränderungen sind auch bei anderen Makromolekülen in wässriger Lösung zu erwarten. Die Enthalpieänderung (ΔH_N^D) für den Transfer von polaren Gruppen aus dem Inneren von Proteinen oder anderen Makromolekülen ist positiv bei niedrigen Temperaturen und negativ bei höheren Temperaturen [29]. Dieser Effekt basiert darauf, dass die polaren Gruppen ihr eigenes geordnetes Wasser produzieren [29]. Kommt es nun zur Zunahme von molekularen Wechselwirkungen erfolgt eine negative Enthalpieänderung. Ausgleich bietet eine positive Enthalpieänderung wenn Wasserstrukturen oder polare Interaktionen in den Proteinen gebrochen werden. Auch das Wasser zeigt bei niedrigen Temperaturen eine bessere Strukturierung [24].

Zusammengefasst zeigen sowohl die Enthalpie als auch die Entropie eine Temperaturabhängigkeit über die Änderung der Wärmekapazität.

$$\Delta H_N^D = \int_{T_1}^{T_2} (C_D(T) - C_N(T)) \cdot dT \quad (2)$$

$$\Delta S_N^D = \int_{T_1}^{T_2} \frac{(C_D(T) - C_N(T))}{T} \cdot dT \quad (3)$$

Dabei stellt C_D und C_N die Wärmekapazität des denaturierten bzw. des nativen Zustandes des Proteins dar [30]. Mit Hilfe der Gibbs-Helmholtz-Gleichung und einer bekannten Wärmekapazität der Proteinumwandlung ist es möglich die Stabilität des Proteins bei einer definierten Temperatur zu beschreiben [30]. Dieser Ansatz könnte ebenfalls dazu dienen die Stabilität von anderen Makromolekülen in Lösung zu beschreiben und erklärt deutlich eine Abhängigkeit verschiedener Untersuchungen von den jeweils herrschenden Temperaturen. Eine Änderung der Proteinfaltung können neben den Temperatureinflüssen, durch Änderungen des pH-Wertes oder gegebenenfalls durch den Zusatz von Salzen zum

wässrigen Medium erfolgen. Einige wasserlösliche Stoffe, sind in der Lage die Strukturierung des Wassers so zu beeinflussen, dass sich damit die Hydratation von Proteinen [31] oder anderen Makromolekülen verändert. So besteht die Möglichkeit über den Zusatz von Salzen die Proteinstrukturen zu stabilisieren oder zu destabilisieren und damit die Löslichkeit zu verändern.

2.1.3 Protein- Salz Wechselwirkungen und die Hofmeister-Serie

Neben den Wechselwirkungen von Proteinen mit Wasser selbst sind Proteine ebenfalls in der Lage mit gelösten Salzen im wässrigen Milieu in Wechselwirkung zu treten. Dabei wird der Effekt von bestimmten Salzen bzw. deren Ionen auf die Proteinestabilität über die Hofmeister-Serie sehr umfassend beschrieben. Bei dieser Serie handelt es sich um eine Abfolge von Ionen, deren Ordnung festgelegt wurde anhand ihrer Fähigkeit eine Mischung von Eiweißproteinen zu fällen (siehe Tab.2) [32]. Die Löslichkeit von Proteinen in wässrigen Lösungen neutraler Salze wird verwendet, um neue Proteine zu klassifizieren und zu charakterisieren. Die Veränderung der Proteinlöslichkeit durch den Zusatz von Salz wurde als erstes von Denis, im Jahre 1856 entdeckt [33]. Inzwischen wurde durch eine Reihe von Untersuchungen festgestellt, dass die ermittelte Abfolge von Ionen, welche in der Hofmeister-Serie aufgeführt sind, bis auf wenige Ausnahmen allgemeine Gültigkeit besitzen. Dabei konnte durch verschiedene Untersuchungen festgestellt werden, dass die Proteinfällung durch Salze nicht nur von der Salzkonzentration abhängig ist sondern auch von der Art des Salzes [34, 35] Es gibt jedoch auch wenige Proteine die im Zusammenhang mit den entsprechenden Salzen und abhängig von den Gegenionen, dem pH-Wert und verschiedenen ionenspezifischen Faktoren einen entgegen gesetzten Effekt zur Hofmeister-Serie zeigen können [26].

Hydratation	stark \leftarrow \Rightarrow schwach
Anionen	$\text{SO}_4^{2-} > \text{HPO}_4^{2-} > \text{Acetat}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^- > \text{NO}_3^-$
Protein	nimmt ab \leftarrow Proteinfällung \rightarrow nimmt zu
Kationen	$\text{Al}^{3+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{NH}_4^+$
Protein	nimmt zu \leftarrow Proteinfällung \rightarrow nimmt ab

Tab.2: Übersicht der häufig verwendeten Ionen geordnet entsprechend der Hofmeister-Serie [26]

Die Wechselwirkungen zwischen Salzen und Proteinen sind ein nachhaltig untersuchtes Phänomen. Es wird verwendet, um Proteine aufzureinigen und ist durch einen geringen Aufwand und niedrige Kosten gekennzeichnet [36]. Durch die Wechselwirkungen mit den Salzen können in bestimmten Konzentrationsbereichen und bei bestimmten pH-Werten Proteine ausgefällt werden. Dabei kann die Proteinfällung einfach erklärt werden als eine

Fähigkeit der eingesetzten Ionen, Wasser zu binden und damit das Wasser so zu verändern, dass das Protein durch das System nicht mehr ausreichend stabilisiert wird [26]. Am effektivsten erfolgt die Ausfällung von Proteinen mit Hilfe von Salzen am isoelektrischen Punkt des entsprechenden Proteins [36]. Durch den Salzzusatz kommt es zu einer Zunahme der Konzentration an schlecht hydratisiertem Protein im Medium und das Protein fällt aus unter Freisetzung von schwach geordnetem Grenzflächenwasser.

Je nach Einordnung von bestimmten Salzen in die Hofmeister-Serie besteht die Möglichkeit durch deren Ionen die Struktur von Proteinen zu stabilisieren oder zu destabilisieren [26]. Der stabilisierende Effekt der Ionen ist sowohl von der Ionenkonzentration abhängig [33], als auch von deren hydratisierenden Eigenschaften [32, 37]. Dabei wurde festgestellt, dass Anionen, welche stark hydratisiert vorliegen im wässrigen System sehr gute stabilisierende Wirkungen auf Proteine haben [26]. Schwach hydratisierte Anionen besitzen einen destabilisierenden Effekt auf die Proteinstruktur [26]. Bei den Kationen zeigt sich das Phänomen in umgekehrter Form, d.h. schwach hydratisierte Kationen stabilisieren Proteine besser, während stark hydratisierte Kationen eher destabilisierend wirken (siehe Tab. 2). Für dieses Phänomen ist zu berücksichtigen, dass Anionen stärker hydratisiert werden können als Kationen gleicher Größe, weil Wasserstoffatome sich dem Anion besser annähern können als Sauerstoffatome dem Kation [26]. Es wird vermutet, dass hauptsächlich die Anionen die Ursache für die beobachteten Aussalzeffekte von Salzen an Proteinen bilden.

Verschiedene Untersuchungen zeigen, dass Ionen die Clusterstruktur des Bulkwassers stören oder zerstören können [22]. Es gibt Ionen, welche schwächere Wechselwirkungen mit Wasser verursachen als Wasser selbst und dadurch die Strukturierungen des Wassers brechen so genannte Chaotrope. Ebenso gibt es Ionen, welche stärkere Interaktionen der Wassermoleküle fördern, so genannte Strukturbildner, auch Kosmotrope genannt [22].

Betrachtet man die strukturbildenden als auch die strukturbrechenden Ionen näher, sollte ein größeres Augenmerk auf die Anionen gerichtet werden. Brechen Wasserstoffbrücken rund um ein Anion, welches meistens größere Dimensionen besitzt als ein Kation, dann ist es schwierig für die umgebenen Wassermoleküle einen neuen Partner für Wasserstoffbrücken zu finden. Große Anionen wie Chloride verhalten sich wie hydrophobe Moleküle [26]. Die Bindung z. B. von Chloriden an Oberflächen ist nicht nur abhängig von der Ladung und der Hydratation, sondern auch von van-der-Waalskräften. Weniger große Ionen wie Bromid oder Kalium verursachen partielle Zusammenbrüche in den Clusterstrukturen des Wassers. Des Weiteren wurde für kleine Ionen wie Na^+ , H^+ , F^- festgestellt, dass die erste Hydrathülle um diese Ionen sehr stark gebunden wird. Durch diese starke Bindung ist das Wasser dort weniger mobil und man findet um diese Ionen herum mehr Wasserstoffbrückenbindungsdefekte [38]. Durch die vermehrten Zusammenbrüche der Wasserstruktur um kleine Ionen wird die Bildung von dichterem Wasser (CS) begünstigt. In

Wasser mit einer geschlossenen Struktur (CS) reichern sich dann auch bevorzugt Proteine an, welche eine starke Hydratation bevorzugen.

Kation n	Ionische Volumen [cm ³ mol ⁻¹]	Hydratations- entropie [kJmol ⁻¹]	Jones- Dole- Viskosität [dm ³ mol ⁻¹]	Anionen	Ionische Volumen [cm ³ mol ⁻¹]	Hydratations- entropie [kJmol ⁻¹]	Jones- Dole- Viskosität [dm ³ mol ⁻¹]
Al ³⁺	-58,7	-396	+0,67	SO ₄ ²⁻	+25	-126	+0,206
Mg ⁺	-32,2	-174	+0,385	HPO ₄ ²⁻			+0,382
Ca ²⁺	-28,9	-132	+0,298	F ⁻	+4,3	-70	+0,127
H ⁺	-5,5		+0,068	Cl ⁻	+23,3	+6	-0,005
Na ⁺	-6,7	-5	+0,085	Br ⁻	+30,2	+28	-0,033
K ⁺	+3,5	+34	-0,009	I ⁻	+41,7	+55	-0,073
NH ₄ ⁺	+12,4	+5	-0,008	NO ₃ ⁻	+34,5	+9	-0,045

Tab. 3: Charakteristische Wirkungen von Ionen der Hofmeister-Serie auf die Eigenschaften des Lösungsmittel Wasser bei 298,15K [39]

Zur besseren Einordnung der verschiedenen Ionen im Bezug auf ihre Einflüsse auf die Wasserstrukturierung erfolgten Wasserbindungsuntersuchungen. Untersucht wurden dabei die Hydratationsentropie, das ionische Volumen und die Jones-Dole-Viskosität [39]. Die Jones-Dole-Viskosität entspricht der relativen Viskosität von salzhaltigen Lösungen. Bei Ionen mit stark gebundener Hydrathülle findet man eine negative Hydratationsentropie, die Jones-Dole-Viskosität zeigt eine leichte Zunahme mit zunehmender Salzkonzentration und das ionische Volumen nimmt ab (siehe Tab. 3) [39]. Eine negative Hydratationsentropie bedeutet, dass der Ordnungsgrad bei der Bildung der Hydrathülle zunimmt. Dabei begünstigen stark hydratisierte Ionen die Ausbildung von kondensiertem Wasser (CS) und die Hydratation von Proteinen.

Bei schwach hydratisierten Ionen reduziert sich die Viskosität des Wasser-Salz-Systems mit zunehmender Ionenkonzentration [39]. Man kann aus den Daten ablesen, dass strukturbildende Ionen, welche die Bildung von dichtem Wasser unterstützen, stark hydratisiert sind, einen positiven Jones-Dole-Viskositätswert aufweisen und für eine Volumenkontraktion des Systems verantwortlich sind. Für strukturbrechende Ionen ermittelt man eine Abnahme der Viskosität, weil sie die Ausbildung von weniger dichten Wasserstrukturen (ES) begünstigen. Die Viskosität (η) einer wässrigen Salzlösung mit einer Konzentration von bis zu 0,1 M ist verglichen mit der Viskosität von Wasser (η_0) bei der gleichen Temperatur abhängig von der Salzkonzentration (c). Dieser Zusammenhang wird mit der Jones-Dole-Beziehung (4) ausgedrückt [26]:

$$\eta/\eta_0 = 1 + Ac^{0,5} + Bc \quad (4)$$

Der Koeffizient A ist ein immer positiver Schätzwert für die Abschirmung der Ionen durch Gegenionen und wird größer mit der Zunahme der Hydratation. A kann in seiner Wirkung auf

die Viskosität nur abgeschätzt werden bei niedrigen Salzkonzentrationen ($< 0,05 \text{ M}$). Der Koeffizient B resultiert aus dem Strukturierungsgrad des Wassers.

Betrachtet man die Eigenschaften der verschiedenen Ionen im Zusammenhang mit der Hofmeister-Serie so stellt man fest, dass Anionen, welche stark hydratisiert sind eher einen stabilisierenden Effekt auf Proteine haben. Begründen lässt sich dieser Effekt durch die von den stark hydratisierten Anionen verursachten stärkeren Wasserstoffbrückenbindungsdefekte. Diese Defekte erleichtern einem Fremdmolekül Wechselwirkungen mit dem Wasser einzugehen. Nimmt jedoch die Konzentration dieser Ionen stark zu, wird das Wasser hauptsächlich an diese Ionen gebunden. Es steht dann nicht mehr ausreichend Wasser für die Hydratisierung von z.B. Proteinen zu Verfügung. Man beobachtet also mit zunehmender Salzkonzentration auch bei stabilisierenden Anionen die Fällung von Proteinen, den so genannten Aussalzeffekt (salt-out) [36]. Für Kationen zeigt sich ein gegenteiliger Effekt, d.h. schwach hydratisierte Kationen haben auf Proteine einen stabilisierenden Effekt (salt-in) [36]. Neben den Wechselwirkungen der Ionen mit Wasser kann es in Lösung auch zu Wechselwirkungen zwischen den Ionen selbst kommen und damit zur Ausbildung von Ionenpaaren. Dabei wird die Ionenpaarbildung besonders begünstigt, wenn die ionische Anziehungskraft sehr hoch ist und die erste Hydrathülle nur schwach ist. Solche schwach hydratisierten Ionen können Proteine in wässriger Lösung nicht stabilisieren.

In wässriger Salzlösung können auch Wechselwirkungen zwischen Ionen und Proteinen auftreten. Es besteht hier die Möglichkeit, dass diese Interaktionen, mögliche Wechselwirkungen mit dem Wasser aufheben können und es zum Aussalzeffekt kommt [36]. Die möglichen Interaktionen sind dabei von den vorliegenden Ionen abhängig. So konnte gezeigt werden, dass beim Vorliegen von divalenten Kationen negativ geladene Proteine auch bei höheren Salzkonzentrationen gelöst bleiben. Wenn das Kation schwach hydratisiert vorliegt, hat es entsprechend der Hofmeister- Serie stabilisierende Effekte auf Proteine [32]. Protein- Salz Wechselwirkungen kann man auf verschiedene Weise messen z.B. mit Hilfe von Dichtebestimmung, über die Bestimmung der Brechungsindizes oder die Bestimmung des osmotischen Druckes mittels Dampfdruckosmometer. Alle verwendeten Methoden zielen auf Interaktionsparameter, welche die Wechselwirkungen zwischen Salzen und Makromolekülen wie auch Proteinen beschreiben.

Zusammenfassend muss man jedoch feststellen, dass trotz der vielen Studien zu den Wechselwirkungsmöglichkeiten von Salzen mit Proteinen man derzeit noch nicht in der Lage ist, ganz allgemein die optimalen Bedingungen für die Stabilisierung von Proteinen in wässrigen Medium vorherzusagen oder zu entwickeln. Anhand der bekannten Einflüsse von Salzen auf Proteine könnte möglicherweise im Zusammenhang mit wässrigen Zweiphasensystemen eine Möglichkeit bestehen die Anreicherung und Stabilität zugesetzter Proteine zu beeinflussen.

2.1.4 Polymer-Polymer, Protein-Polymer und Salz- Polymer Interaktionen in wässriger Lösung

Bei der Betrachtung von Zweiphasensystemen im Zusammenhang mit der Verwendung von Proteinen und Salzlösungen sind diverse Wechselwirkungen zu erwarten, welche die Eigenschaften des verwendeten Zweiphasensystems erheblich verändern können [40]. Wie in den vorangegangenen Abschnitten bereits erwähnt, sind die Interaktionen des Wassers mit den Salzen, Polymeren und Proteinen von entscheidender Bedeutung. Dabei wurden die Wechselwirkungen zwischen Proteinen mit Wasser und zusätzlichen Salzen betrachtet. Hier wurde gezeigt, dass die Hydratation von Proteinen abhängig ist von den funktionellen Gruppen der Proteine und der Fähigkeit mehr oder weniger starke Wasserstoffbrücken aufzubauen. Wird einem Protein-Wasser-Gemisch nun ein Salz zugesetzt kann das Salz die aufgebaute Wasserstrukturierung so verändern, dass das Protein aus der Mischung verdrängt wird oder so beeinflussen das sich das Protein noch besser im Medium Wasser verteilt [41]. Dabei ist das zu erwartende Resultat der Mischung von Salz und Protein in Wasser abhängig davon, ob die beiden Substanzen die Bildung der gleichen Wasserstruktur begünstigen oder nicht. Gleichzeitig wird das Ergebnis des Mischprozesses auch davon beeinflusst, ob genug Wasser für die Hydratation von Protein und Salz vorhanden ist.

Theoretisch kommen die Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Wasser den Interaktionen zwischen Polymeren und Wasser recht nahe. Es ist bekannt, dass eine Mischung von Salz und Polymer zweiphasige Systeme ausbilden können [1]. In diesen Systemen bilden sich meist eine polymerreiche Phase und eine salzreiche Phase [1]. So könnte man die Separation eines Salz-Polymer-Wassergemisches in zwei Phasen auch als Aussalzeffekt betrachten. Dabei ist z.B. bekannt, dass die Bildung von zweiphasigen Systemen durch die Mischung von Polyethylenglykol (PEG) und Salz in Wasser der Hofmeister-Serie folgen [42, 43]. So entstehen durch die Verwendung von Salzen wie Kaliumphosphat zweiphasige Mischungen, mit einer wässrigen PEG-Phase und einer Kaliumphosphatreichen Wasserphase [1]. Von dieser Art der Separation abzugrenzen ist die Ausfällung bestimmter gelöster Stoffe durch Zusatz eines oder mehrerer Substanzen oder Lösungsmittel unter der Bildung eines unlöslichen Bestandteils. Die Effektivität der Separationsvorgänge von Salz-PEG-Wassermischungen ist dabei abhängig von der bevorzugten Hydratation der Ethylenoxid Einheiten des Polyethylenglykols. Salze wie Natriumchlorid, welche die bevorzugte Art der Hydratation von PEG begünstigen, bilden schlechter zweiphasige Mischungen [42].

Betrachtet man die Interaktion zwischen Proteinen und Polymeren am Beispiel von Lysozym mit Polyethylenglykol so zeigt sich, dass niedermolekulare Polyethylenglykole das Protein ähnlich wie stark hydratisierte Anionen stabilisieren können [44]. Für länger-kettige Polyethylenglykole steigt hingegen die Möglichkeit der Proteinfällung ähnlich eines Effektes

durch den Anstieg der Salzkonzentration. Also auch beim Wechselspiel von Proteinen mit Polymeren ist die Art der Hydratation und der resultierenden Wasserstruktur um die Moleküle von entscheidender Bedeutung für das Resultat einer solchen Mischung. Die oft diskutierten Theorien zur Separation von Proteinen durch Verarmungswechselwirkungen zwischen großen Kolloidmolekülen, basierend auf elektrostatischen Wechselwirkungen und van-der-Waalskräften [18, 19, 20], müssen dahingehend neu bewertet werden, dass sie Hydratations- und Wasserstrukturierungseffekte für Betrachtungen von wässrigen Systemen berücksichtigen.

2.2. Hydrogele als Systeme für die Freisetzung von Proteinen

Im Allgemeinen handelt es sich bei Hydrogelen um hydrophile Netzwerke, die in der Lage sind im Vergleich zu ihrem Trockengewicht hohe Mengen an Wasser aufzunehmen [8]. Sie lassen sich durch begrenzte Quellung von makromolekularen, organischen oder anorganischen Substanzen herstellen [45]. Die Ausbildung von Hydrogelnetzwerken auf der Basis von Makromolekülen kann auf zwei unterschiedliche Arten erfolgen.

Es gibt reversible, physikalisch verknüpfte Hydrogele. Hierbei hält das Netzwerk ausschließlich durch physikalische Wechselwirkungen zusammen. Die so entstehenden Verknüpfungen sind häufig schwächer als kovalente chemische Bindungen. Es gibt unterschiedliche Wechselwirkungen, die zu einem nicht kovalent gebundenen Gelnetzwerk führen können, dazu gehören Wasserstoffbrückenbindungen, ionische Wechselwirkungen (Coulombsche Kräfte), Dipol-Dipol-Wechselwirkungen oder van-der-Waalssche Kräfte. Des Weiteren findet man unter den physikalischen Vernetzungsmöglichkeiten Kristallisationsprozesse, die Bildung von Netzwerken durch mechanisches Verhaken oder Verschlaufen von Polymerketten, sowie in den letzten Jahren auch die Bildung von Gelen durch Proteinwechselwirkungen vom Typ Antigen-Antikörperreaktionen [8, 46]. Physikalische Gelnetzwerke besitzen durch die Vielzahl möglicher Wechselwirkungen durch die sie gebildet werden keine homogene Struktur. Es gibt verschiedene Beispiele für physikalische Netzwerke. So entsteht durch die Kombination eines multivalenten Ions wie dem Calciumion und einem entgegen gesetzt geladenen Polyelektrolyt wie Alginsäure ein ionotropes Gel [8]. Weitere physikalische Gele können entstehen durch die Kombination von gegensätzlich geladenen Polyelektrolyten. Bei dieser Reaktion kann ein Gel entstehen oder eine Ausfällung, in Abhängigkeit von Faktoren wie der Konzentration der Polyelektrolyte, der Ionenstärke und dem pH-Wert der Lösung. Dieser Vorgang wird auch Komplexkoazervation genannt [8]. Alle Wechselwirkungen, welche mit der Bildung von nicht kovalenten Gelen einhergehen sind reversibel und können durch Änderungen der äußeren Bedingungen, wie durch die Verschiebung des pH-Wertes, der Temperatur oder durch den Zusatz spezieller Substanzen unterbrochen werden [8].

Eine weitere Möglichkeit Hydrogelnetzwerke zu formen, besteht über den Aufbau von kovalenten Bindungen. Chemisch gebundene Hydrogele werden durch die Vernetzung von meist wasserlöslichen Polymeren gebildet. Eine kovalente Vernetzung bietet den Vorteil gegenüber einer physikalischen Vernetzung, dass Hydrogele mit einer besseren mechanischen Stabilität entstehen [8]. Dabei besitzen die chemisch vernetzten Gele ebenfalls keine homogene Struktur. Es finden sich Bereiche im Gelgerüst mit vielen Verknüpfungen und wenig eingelagertem Wasser und Bereiche mit geringem Vernetzungsgrad und hoher Wassereinlagerung [8]. Die kovalent gebundenen Hydrogele können in Abhängigkeit von Ihrer Vernetzungsdichte nur im begrenzten Maße quellen.

Für die chemische Vernetzung von Gelen können unterschiedliche Methoden wie z.B. die Polymerisation über Radikale, sowie enzymatische oder chemische Reaktionen verwendet werden [3]. Eine gut untersuchte Möglichkeit chemisch vernetzte Hydrogele herzustellen besteht z.B. über die Verwendung von Methacrylaten als Brückenbildner [8, 47, 48]. Acrylatgruppen lassen sich gut über Radikalkettenreaktion verknüpfen [47]. Eine weitere Methode zur Herstellung von kovalent gebundenen Netzwerken verwendet die Kopolymerisation von Monomeren mit Hilfe eines Crosslinkers. Andere Reaktionen nutzen bestimmte funktionelle Gruppen der eingesetzten Monomere oder Polymere für eine chemische Verknüpfung. So können Stoffe, welche Hydroxyl-, Amin- oder Hydrazingruppen enthalten vernetzt werden mit Aldehyden [8]. Eine weitere Möglichkeit der chemischen Vernetzung besteht über Kondensationsreaktionen zwischen Alkoholen bzw. Aminen und Carbonsäuren. Für diese Reaktionen sind meist so drastische Bedingungen notwendig, so dass diese Methoden keine Anwendung finden, um sensible Stoffe wie Proteine oder Zellen in das Polymergelgerüst einzuschließen. Andere Reaktionen nutzen hochenergetische Bestrahlungen von ungesättigten Funktionen mit Gammastrahlung zur Vernetzung, wie z. B. Vinylgruppen für die Bildung von Hydrogelen [8]. Bei der Polymerisation über Bestrahlung kann die Reaktion bei relativ milden Bedingungen, wie Raumtemperatur und physiologischem pH-Wert durchgeführt werden können. Allerdings kann es durch die Strahlung zu Veränderungen an den zu inkorporierenden Proteinen oder Zellen kommen. In letzter Zeit finden sich auch Ansätze Polymervernetzungen mit Hilfe von Enzymen durchzuführen [3].

Für die Arbeit mit biologisch sensiblen Stoffen im Zusammenhang mit kovalent verknüpften Hydrogelen wurden inzwischen neue Verfahren entwickelt. Dabei finden Methoden im wässrigen Milieu Anwendung, wie die Durchführung von Emulsionspolymerisationen.

Die Arbeiten von Wichterle [49] und Lim mit vernetzten Hydroxyethylmethacrylat (HEMA)-Hydrogelen für die Verwendung in medizinischen Applikationsbereichen führten dazu, dass Hydrogele als interessantes Gebiet für die Entwicklung von biologisch verträglichen Materialien stärker untersucht wurden [8]. Dabei zeigen die Hydrogele eine besonders gute

Biokompatibilität da ihre hydrophile Oberfläche wenig destabilisierende Wechselwirkungen mit Proteinen oder Zellmaterial eingeht. Es finden sich sowohl synthetische, als auch natürliche Hydrogelbildner für den Einschluss und zur Stabilisierung von lebenden Zellen. Diese in Gel eingebetteten Zellen werden im Bereich der Zellkultivierung und Forschungen auf dem Gebiet der Geweberegeneration eingesetzt [8].

Eine Vielzahl von Hydrogelen findet Anwendung am Menschen, beginnend bei Kontaktlinsen, über Implantate, Mikrosphären, Pflaster, Tabletten und Filmüberzügen für verschiedene Arzneiformen [22, 47].

Für die Entwicklung von neuen Arzneiformen auf der Basis von Hydrogelen ist es wichtig geeignete Polymere anhand verschiedener Parameter auszuwählen. Dabei sollte die Auswahl entsprechen den Anforderungen an die spätere Anwendung erfolgen (Abbildung 2). Für die Anwendung am oder im Menschen ist es erforderlich, Substanzen mit einer guten biologischen Verträglichkeit zu verwenden. Für diesen Anwendungsbereich ist zu gewährleisten, dass sich die verwendeten Stoffe durch entsprechende Metabolisierungsprozesse wieder restlos aus dem Körper entfernen lassen. Dabei richtet sich die Auswahl der Ausgangsstoffe nach der Applikationsart und dem Anwendungsort.

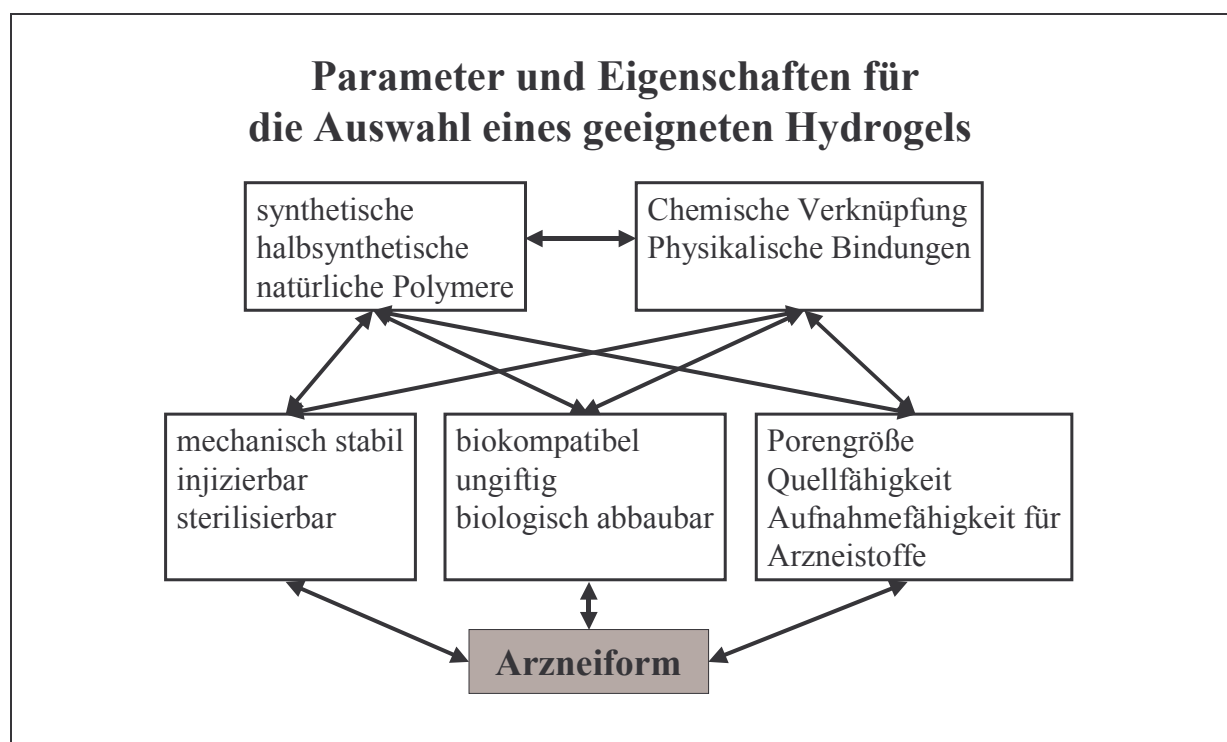


Abb. 2: Auswahl geeigneter Parameter und Eigenschaften für die Entwicklung einer Hydrogel-arzneiform

Einige hydrogelbildene Polymere werden schon längere Zeit am oder im Menschen angewandt. Dabei handelt es sich um Substanzen, welche zum Teil auch als Plasmaexpander eingesetzt werden. Als Plasmaexpander werden sowohl natürliche als auch synthetische und halbsynthetische Polymere eingesetzt. Diese Polymere bieten den Vorteil, dass ihre Verträglichkeit im Bezug auf die Anwendung am Menschen sehr gut untersucht ist.

Um aus einem solchem gut untersuchten Polymer ein Hydrogel herzustellen, ist es notwendig diese Makromoleküle miteinander zu größeren Netzwerken zu verbinden. Dafür ist eine Vielzahl an neuen Vernetzungsmethoden über kovalente oder nicht kovalente Bindungen bekannt.

Für bestimmte Applikationsarten ist es sinnvoll, Hydrogele zu entwickeln, deren Gerüststruktur durch enzymatische oder chemische Prozesse wie Hydrolyse biologisch abbaubar ist. Um solche Abbaureaktionen an einem kovalent gebundenen Hydrogel zu gewährleisten bieten sich verschiedene Ansatzpunkte. Es können als Ausgangsstoffe für die Hydrogelbildung biologisch abbaubare Strukturen verwendet werden z.B. Pektine, Gelatine oder Stärken [8]. Des Weiteren können hydrolytisch abbaubare Gruppen in das Hydrogelgerüst eingefügt werden, wie Ester um eine Zersetzung des Netzwerkes über einen definierten Zeitbereich zu ermöglichen.

Es zeigt sich, dass für die Herstellung von Hydrogelen eine Vielzahl von Methoden entwickelt worden sind, welche für das jeweilige angestrebte Anwendungsgebiet der Gele unterschiedliche Vor- und Nachteile aufweisen [4, 50, 51]. Anhand der benötigten Eigenschaften des Hydrogels für die verschiedensten Anwendungsbereiche sollte es möglich sein für jedes angestrebte Produkt ein optimales Verfahren zu entwickeln.

2.3. Wässrige Zweiphasensysteme für die Herstellung von proteinbeladenen Drug Delivery Systemen

Mit der Entwicklung von neuen biotechnologischen Verfahrensweisen wurden in den letzten Jahren eine Vielzahl an neuen höhermolekularen Wirkstoffen aus der Klasse der Peptide und Proteine hergestellt. Im Zuge des expandierenden Marktes für diese Wirkstoffe verstärkte sich auch das Interesse an kontrollierten Freisetzungssystemen, für einige der neu gefundenen Pharmaproteine. Für die Applikation von Proteinen bestehen einige deutliche Unterschiede die beider Entwicklung von Arzneiformen eine entscheidende Rolle spielen. Proteine lassen sich nicht oral applizieren, wie klassische Arzneimittel da sie im Gastrointestinaltrakt sehr zügig durch körpereigene Proteasen abgebaut werden. Des Weiteren können sie die Darmmukosa nicht als intakte Proteine passieren. Auch bei der Anwendung über nasale Applikation wird die Verfügbarkeit des eingesetzten Wirkstoffes limitiert durch die kleine Absorptionsfläche, die in Abhängigkeit von ihrer Größe begrenzte Möglichkeit die Schleimhaut zu passieren und die schnelle Entfernung der eingesetzten Wirkstoffe über Sekretbildung und den Ziliarapparat [52]. So bietet sich hauptsächlich die parenterale Applikation der Pharmaproteine für die Anwendung. Dabei zeigt auch die parenterale Verabreichung einige Nachteile. Dazu gehören die schmerzhafteste Injektion und die Notwendigkeit von geschultem Personal für die Durchführung der Injektion. Des Weiteren ist die systemische Verteilung des eingesetzten Proteins häufig nicht wünschenswert, weil es

dadurch schneller zur Bildung von Antikörpern kommen kann, mehr Wirkstoff für die Therapie benötigt wird und es durch die Wechselwirkungen mit anderen Organen auch zu unerwünschten Wirkungen des Pharmaproteins kommen kann. In vielen Fällen ist es daher sinnvoll eine lokal an den Wirkort applizierbare kontrolliert verzögert freisetzen- de Arzneiform zu entwickeln.

Für die kontrollierte Freisetzung von Proteinen wurden inzwischen verschiedenste Formulierungskonzepte entwickelt. So ist die Bildung von Proteinsuspensionen als Depotpräparat bekannt, wie z.B. die Insulin-Zink-Suspension für die Wirkstofffreigabe innerhalb von ein bis zwei Tagen [5]. Dabei gestaltet sich die Kontrolle der Wirkstofffreigabe bei diesen Systemen relativ schwierig. Alternativ dazu finden sich Arzneiformen, in denen die Wirkstoffe eingebettet werden, dadurch ist die Freisetzung des Wirkstoffes hauptsächlich über den Abbau der Einbettungsmatrix definiert [52]. Als parenterale Applikationsform für eingebettet Wirkstoffe findet man Mikrokapseln, mikropartikulare Systeme oder Implantate.

Für die Herstellung von Mikropartikeln und Implantaten sind verschiedene Methoden bekannt. Dabei ist das gebräuchlichste Verfahren für die Implantatherstellung die Extrusion [52]. Dieses Verfahren ist jedoch durch die auftretenden Temperaturen und Drücke für die Verarbeitung von Proteinen ungeeignet. Für die Mikropartikelherstellung wurde bei den klassischen Verfahren der Wirkstoff in organisches Lösungsmittel oder in eine wässrige Lösung eingearbeitet, um dann mit Hilfe der Sprühtrocknung, der Koazervation oder einer W/O/W-Emulsion mikropartikulare Strukturen zu formen [52]. Ein großer Nachteil dieser Verfahren ist die Verwendung von organischen Lösungsmitteln und die thermische Belastung, welche bei der Verarbeitung von Proteinen zu erheblichen Wirkstoffverlusten führen kann.

Eine neuere Entwicklung ist die Verwendung von Hydrogelbasierten Technologien für die Herstellung von Arzneiformen für Proteine [5]. Dabei bieten Hydrogele den Vorteil einer proteinfreundlichen Umgebung und zeigen eine gute biologische Verträglichkeit. Die Freisetzung der Proteine kann kontrolliert werden über den Abbau des Hydrogels und Diffusionsprozesse. Unter den Hydrogelbildnern findet man natürliche, halbsynthetische und synthetische Makromoleküle. Dabei zeigen einige Mischungen der Hydrogelbildner in wässrigen Systemen ein besonderes Phänomen, es kommt zu Bildung von Zweiphasensystemen.

Betrachtet man in diesem Zusammenhang verschiedene Zweiphasensysteme so finden häufig Systeme aus PEG und Dextran Anwendung für die Aufreinigung von biologischen Materialien [1, 21]. Alternativ findet man auch zweiphasige Mischungen auf der Basis von Cashewnußbaumgummi bzw. Hydroxypropylstärke und PEG [53, 54, 55]. Mischt man die beschriebenen zweiphasigen Systeme kommt es zur Bildung von Wasser in Wasser-Emulsionen. Da bereits seit Längerem Emulsionen zu Herstellung von mikropartikularen Systemen verwendet wurden, bot es sich an die über Zweiphasensysteme herstellbaren W/

W-Emulsionen für die Entwicklung von proteinbeladenen Freisetzungssystemen zu untersuchen [5]. Der Vorteil dieser neuen Methodik ist das Fehlen organischer Lösungsmittel, welche die Proteininstabilität stark beeinträchtigen können [2, 4, 5, 6].

Wird ein wässriges Zweiphasensystem gemischt, entsteht ein System, welches einer Wasser in Wasser Emulsion entspricht. Man kann dabei eine disperse Innenphase von einer kontinuierlichen Außenphase unterscheiden, wie man es sonst bei klassischen Emulsionen vorfindet. Diese emulsionsartige Mischung neigt dazu in kurzer Zeit Phasentrennung zu zeigen. Dabei wird häufig festgestellt, dass die disperse Phase die untere Phase des entstehenden Zweiphasensystems bildet und die kontinuierliche Phase der oberen Phase entspricht. Befindet sich in der dispersen Phase als Makromolekül eine polymerisierbare Verbindung und wird ein Polymerisationsprozess während der emulsionsartigen Zwischenphase gestartet, ist es möglich durch den Vernetzungsprozess Hydrogel-Mikropartikel zu herzustellen (siehe Abb. 3) [4]. Gelingt es einen Wirkstoff wie z.B. ein Protein in der polymerisierbaren Phase anzureichern, besteht die Möglichkeit diesen Wirkstoff in dem Vernetzungsprodukt einzuschließen.

Weitere Methoden verwenden wässrige Zweiphasensysteme im Zusammenhang mit Sprühtrocknungsprozessen zur Verkapselung von Proteinen, wobei hier die thermische Belastung als Nachteil anzusehen ist [50].

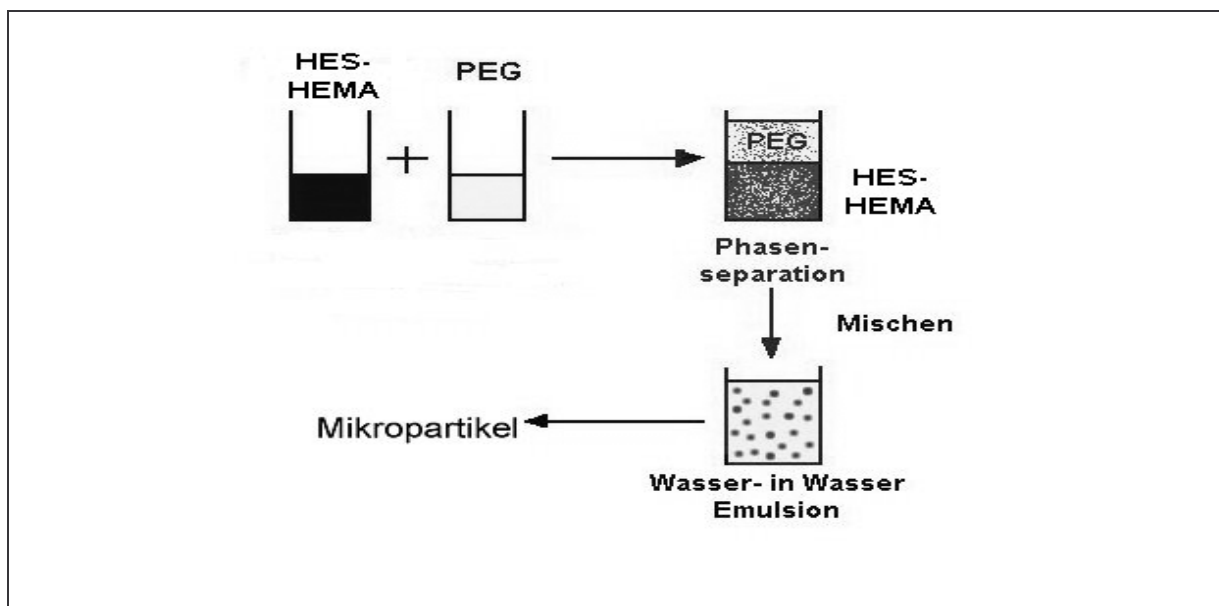


Abb. 3: Schematische Darstellung der Mikropartikelherstellung

Es zeigt sich, dass durch die Verwendung von wässrigen Zweiphasensystemen zur Herstellung von proteinbeladenen Systemen der Abbau von Protein durch zum Beispiel oxidative Prozesse stark minimiert werden kann [5]. Ein weiterer Vorteil dieser neuen Verfahrensweise ist, dass bei der Verwendung von hydrogelbildenden Polymeren zur Herstellung von z.B. Mikropartikeln, diese häufig eine gute Biokompatibilität zeigen.

Intensiv wurden für die Herstellung von proteinbeladenen Hydrogel Drug Delivery Systemen dabei bisher Zweiphasensysteme untersucht basierend auf PEG und Dextran [2, 4, 50].

Wobei das Dextran mit verschiedenen polymerisierbaren Funktionen derivatisiert wurde [12]. Durch die Auswahl des Substituenten kann sowohl die Proteinfreisetzung kontrolliert werden, als auch die biologische Abbaubarkeit und Verträglichkeit des entstehenden Drug Delivery Systems. Für die Kontrolle der Proteinfreisetzung ist es daher notwendig Verfahren zu entwickeln, welche die komplette Kontrolle über die polymerisierbare Verbindung, den Polymerisationsprozess und die gebildeten Vernetzungen ermöglicht

Dazu werden in dieser Arbeit neue Ansätze für die Entwicklung von Hydrogelmikropartikeln mit Hilfe eines wässrigen Zweiphasensystems verfolgt und in den folgenden Abschnitten beschrieben.

3. Material und Methoden

3.1. Materialien

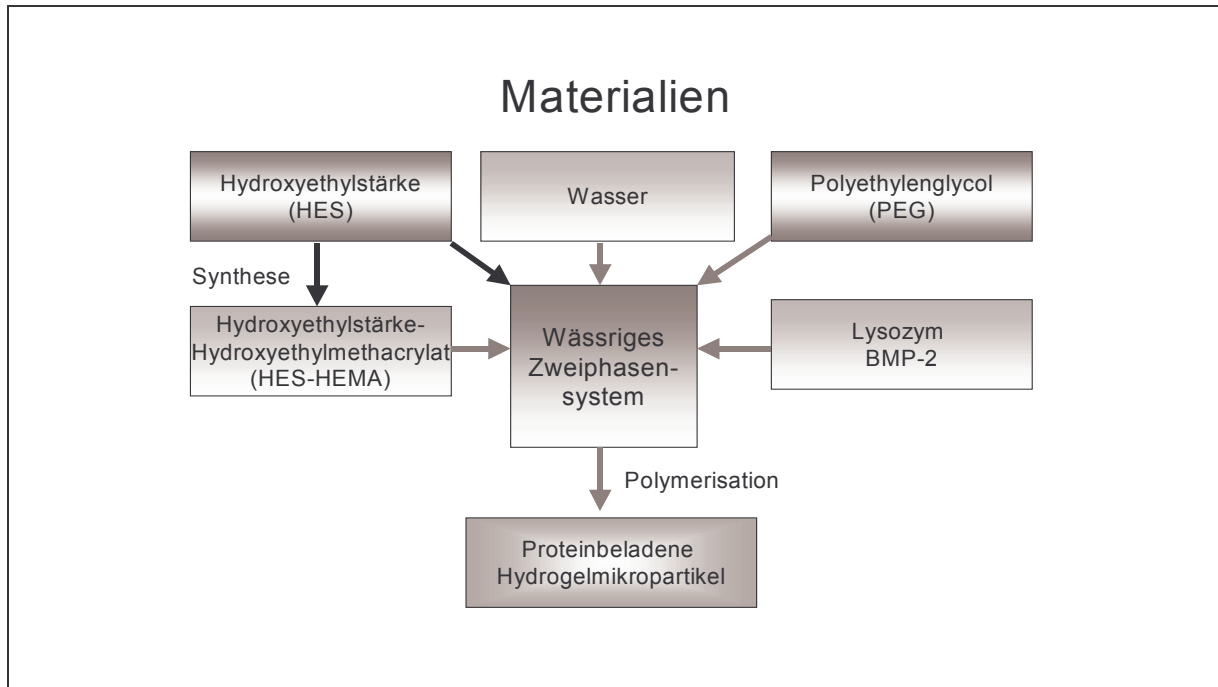


Abb. 4: Übersicht über die verwendeten Materialien

In Abbildung 4 sind die in diesem Abschnitt näher beschriebenen Materialien bzw. Substanzen aufgeführt und ihre Bedeutung in dieser Arbeit verdeutlicht.

3.1.1 Hydroxyethylstärke (HES)

Für die Untersuchungen und Herstellungsprozesse wurde Hydroxyethylstärke verwendet, welche uns von der Firma Fresenius Kabi AG freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde. Dabei handelte es sich um HES 130/0,4 der Charge 21812, HES 450/0,7 der Charge 9703141 und HES 200/0,5 der Charge 40432 verwendet [56].

Hydroxyethylstärke (siehe Abb.5) ist ein Produkt aus Wachsmaisstärke, welches durch Hydrolyse, Hydroxyethylierung und Ultrafiltration gewonnen wird [11]. Die verwendete Wachsmaisstärke besteht zu über 95 % aus hochmolekularem Amylopectin, einer verzweigten Kette von α -1,4 und α -1,6 verknüpften Glucoseeinheiten [11].

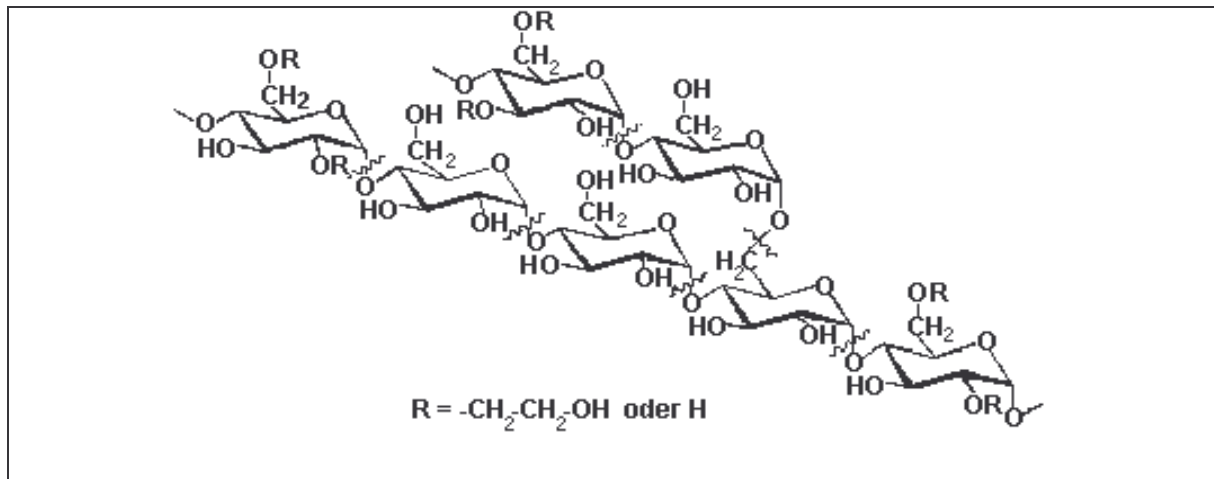


Abb. 5: Ausschnitt aus der Struktur der Hydroxyethylstärke

Die Hydroxyethylierung dient der Aufspreizung des Moleküls, daraus resultieren eine Abbauverzögerung und eine erhöhte Wasserbindungskapazität des Polysaccharidmoleküls. Die verwendete Hydroxyethylstärke wird je nach klinischem Anwendungsbereich mit verschiedenen physikochemischen Eigenschaften angeboten. Für die Entwicklung eines neuen wässrigen Zweiphasensystems wurden die in Tabelle 4 aufgeführten Stärken untersucht.

Charakteristika	HES 200/0,5	HES 450/0,7	HES 130/0,4
MW	240.000 ± 50.000	650.000 ± 150.000	130.000 ± 20.000
Mn	ca. 70.000	ca. 100.000	ca. 50.000
MS	0,40-0,50	0,7-0,8	0,38-0,45
DS	0,38-0,50	0,55-0,7	0,32-0,40
C2/C6-Substitutionsverhältnis	4-5,1	4-5/1	≥8
Mw Bodenfraktion (10 % der kleinsten Moleküle)	≥ 13.000	≥ 19.000	≥ 15.000
Mw Spitzenfraktion (10 % der größten Moleküle)	≤ 780.000	≤ 2.170.000	≥ 380.000

Tab. 4: Physikochemische Eigenschaften der verwendeten HES aus [11]

Es gibt einige Besonderheiten bei den verwendeten Stärken. So zeigt die Hydroxyethylstärke HES 200/0,5 eine therapeutische Gleichwertigkeit zu der HES 130/0,4. Die HES 130/0,4 besitzt dabei im Vergleich zur HES 200/0,5 eine engere Molekulargewichtsverteilung und einen wesentlich geringeren Anteil an hochmolekularen Bestandteilen [11]. Die Unterschiede in der Molekulargewichtsverteilung sind in Abbildung 6 dargestellt.

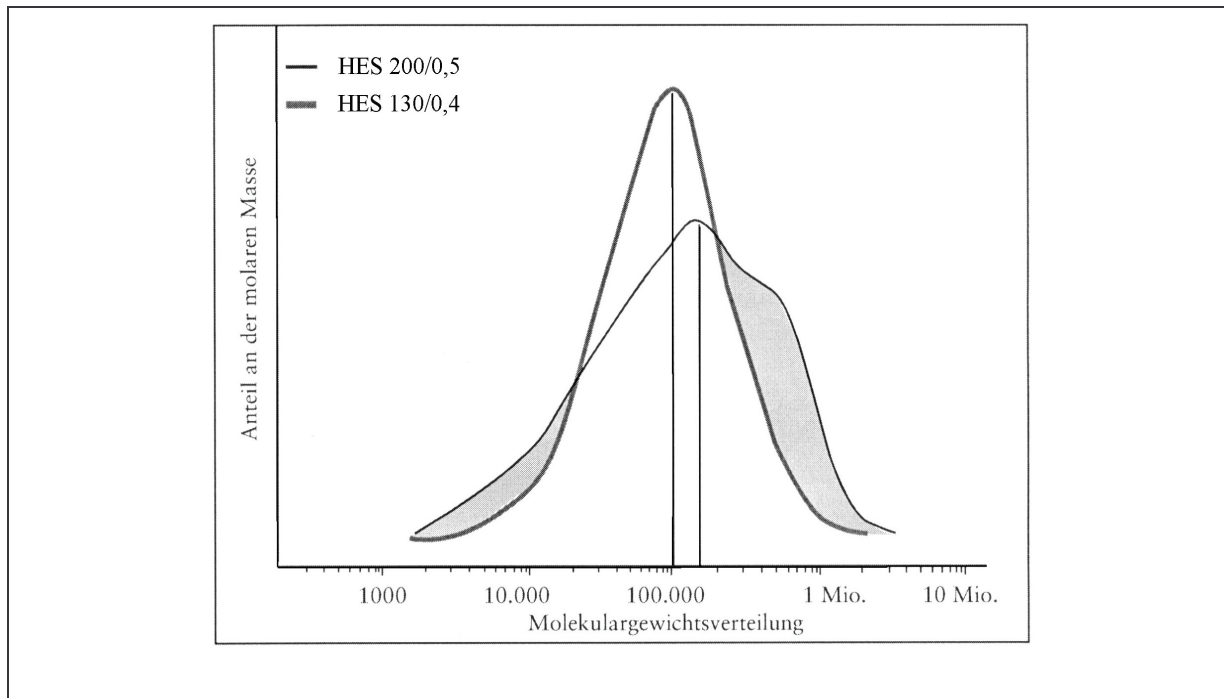


Abb. 6: Molekulargewichtsverteilung von HES 200/0,5 und HES 130/0,4 aus [11]

Man kann deutlich erkennen, dass die HES 200/0,5 eine breitere Molekulargewichtsverteilung zeigt als die HES 130/0,4. Dabei zeigt die Hydroxyethylstärke 130/0,4 eine monomodale Partikelgrößenverteilung. Diese beiden Hydroxyethylstärken wurden unabhängig davon, dass es sich bei beiden nur um unterschiedlich stark aufgereinigte Stärken einer Produktion handelt, separat untersucht.

3.1.2 Polyethylenglycol (PEG)

Verwendet wurde Pluriol E 8.000 und 12.000, welches uns freundlicherweise von BASF zur Verfügung gestellt wurde. Dabei handelt es sich um ein komplexes Gemisch von PEG unterschiedlicher Kettenlänge. Es wurde Polyethylenglykol mit einer Molekulargewichtsverteilung von Mw 7000-9000 g/mol für das Pluriol E 8.000 der Charge 2940490 und Mw von 10000- 14.000 g/mol für Pluriol 12.000 mit der Charge 731353 verwendet. Dabei erfolgte die Bestimmung des Molekulargewichtes über Berechnungen aus der Hydroxylzahl. Bei den verwendeten Polyethylenglycolen handelte es sich nicht um Arzneibuchqualitäten, da PEG größerer Kettenlänge nur für die technische Anwendung produziert werden.

3.1.3 HEW-Lysozym

Lysozym oder auch 1,4-Beta-N-Acetylmuramidase C ist ein globuläres Protein, welches zu den Mucopolysaccharidasen gehört [30, 57]. Die erste Entdeckung des Lysozym erfolgte durch Sir Alexander Fleming 1922 im Hühnereiweiß (**Hen Egg White**). Es handelt sich um ein Protein, welches sich für gewöhnlich in tierischen Körperflüssigkeiten als auch in Pflanzen nachweisen lässt [45]. Lysozym zeigt gute Bakterien abtötende Wirkungen und wird daher in

der Lebensmittelindustrie als Konservierungsmittel E 1105 hauptsächlich gegen Clostridien eingesetzt. Außerdem findet Lysozym Anwendung in der Humanmedizin bei Wundinfektionen [30].

Das HEW-Lysozym ist mit einer Molekülgröße von 14,31 kDa (Kilodalton) ein vergleichsweise kleines Protein. Es handelt sich dabei um ein monomeres Polypeptid aus 129 Aminosäuren [57].

Lysozym ist beispielhaft für eine so genannte $\alpha+\beta$ Faltblattstruktur. Man findet im Lysozym drei Helix-Bereiche, sowie davon abgesetzt eine antiparallele Faltblattstruktur. Dabei trägt die mittlere Kette des Faltblattes eine der reaktiven Gruppen des aktiven Zentrums. Lysozym ist ein Enzym, welches die 1,4- beta Verknüpfungen zwischen N- Acetylmuraminsäure und N-Acetylglucosaminresten von Muramin hydrolysiert. Das pH- Optimum dieser hydrolytischen Reaktion liegt bei 5,5. Das Enzym ist aktiv in einem pH- Bereich zwischen pH 5,0 und pH 7,0 und mit seinem Temperaturoptimum bei 40 °C [57].

3.1.4 Bone morphogenetic protein-2

Bei Bone morphogenetic protein- 2 (BMP- 2) handelt es sich um ein Glykoprotein aus einer Proteingruppe, welche an der Organ und Gewebeentwicklung beteiligt sind [58]. Das natürliche BMP-2 besitzt eine homodimere Struktur, verknüpft durch eine Disulfidbrücke (siehe Abb. 7), und kann aufgrund seiner Aminosäuresequenz zur Proteinfamilie der transformierenden Wachstumsfaktoren- β (TGF- β) gezählt werden [59]. Die Monomere des Proteins sind dabei über drei Disulfidbrücken im Ketteninneren verknüpft zum Dimer. Das verwendete rekombinant hergestellte BMP-2 hat ein Molekulargewicht von 2*13 kDa, einen isoelektrischen Punkt bei 7,95 und ist löslich und stabil im leichtsauren Milieu [60].

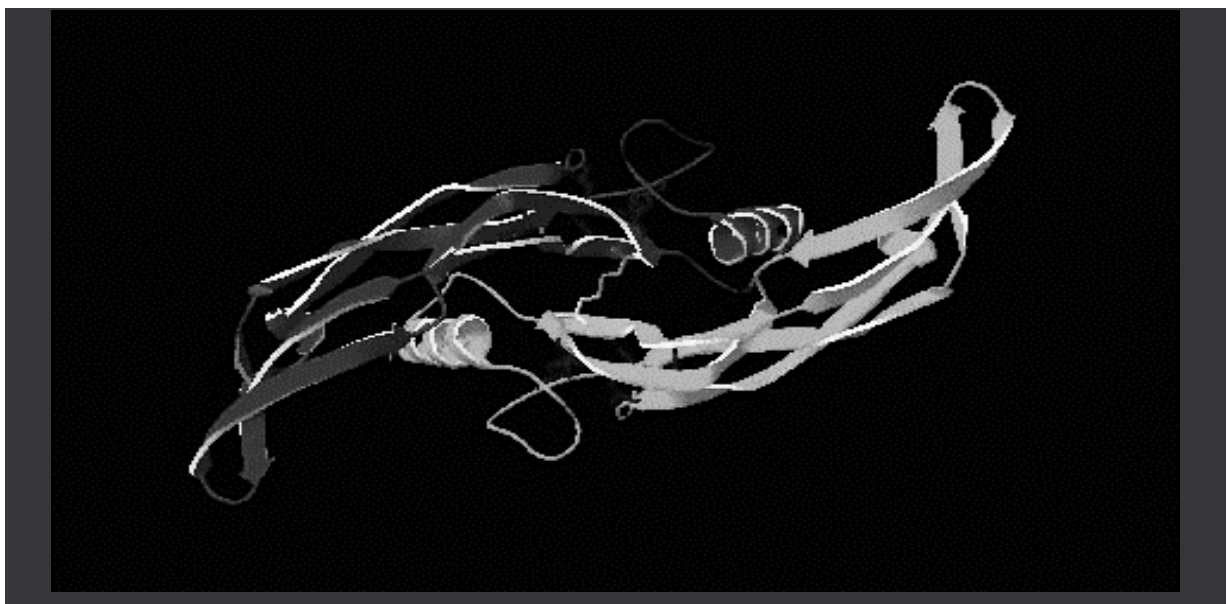


Abb. 7: Struktur von BMP-2 [58]

Die BMP's sind Proteine, welche in verschiedene Entwicklungsprozesse an unterschiedlichen Organen und Geweben eingreifen und somit steuernd wirken können. Sie spielen eine äußerst wichtige Rolle bei der Regenerierung verschiedener Gewebeerkrankungen oder Erkrankungen. So ermöglichen die BMP-2 die Stimulation der Knochenheilung oder die Aktivierung des Knochenwachstums an verlagelter Stelle [58, 60, 61].

Für die erfolgten Untersuchungen wurde in *Escherichia Coli* rekombinat hergestelltes BMP-2 aus dem Arbeitskreis Gross verwendet [60, 62]. Dabei weisen rekombinat hergestellte BMP-2 keine Glykosilierung auf sonder es handelt sich um das reine homodimere Protein.

3.1.5 Reagenzien, Substanzen, Lösemittel

Natriumphosphat	Merck, D-Darmstadt
Seesand (p.a.)	Roth, D-Karlsruhe
Bariumchlorid (reinst.)	Merck, D-Darmstadt
Perchlorsäure	Riedel-de Haen, D-Seelze
Iodlösung	Roth, D-Karlsruhe
Natriumacetat (wasserfrei)	Roth, D-Karlsruhe
α - Amylase (<i>Bacillus subtilis</i>) Lot 0100782209	Sigma-Aldrich, D-Schnelldorf
Pullulanase (<i>Klebsiella pneumoniae</i>)	Sigma-Aldrich, D-Taufkirchen
Amyloglycosidase (<i>Rhizopus</i> sp.) Lot 122K1561	Sigma-Aldrich, D-Schnelldorf
Calciumchlorid (Ph. Eur.)	Merck, D-Darmstadt
Wasserstoffperoxid 30 %	Roth, D-Karlsruhe
Schwefelsäure 96 %	Merck, D-Darmstadt
Hydroxyethylmethacrylat (<1 % Methacrylsäure)	Merck, D-Darmstadt
Carbonyldiimidazol (98 %)	Merck, D-Darmstadt
Tetrahydrofuran (wasserfrei)	destilliert
Stickstoff	
Hydrochinonemonomethylether (> 99 %)	Merck, D-Darmstadt
Ethylacetat (>99 %)	Merck, D-Darmstadt
Magnesiumsulfat (wasserfrei)	Fluka
Dimethylsulfoxid (<0,01 % Wasser)	Merck, D-Darmstadt
4-(N,N-Dimethylamino)pyridin (99 %)	Merck, D-Darmstadt
Salzsäure (36 %)	Riedel-de Haen, D-Seelze
Destilliertes Wasser	Destillation
Chloroform	Merck, D-Darmstadt
Kieselgelplatten	Roth, D-Karlsruhe

Kaliumpermanganatlösung	
Deuteriertes Chloroform	Armar
Deuteriertes Wasser	Acros
PL-Mixed C Säule	Polymer Laboratories
DMF (0,1 M LiBr)	Fluka
Brilliant Blue (G-250)	Roth, D-Karlsruhe
Ethanol (95 %)	Roth, D-Karlsruhe
Phosphorsäure (85 %)	Roth, D-Karlsruhe
Sigmamarker® Low Range (Mw 6,5-60 kDa)	Sigma-Aldrich, D-Schnelldorf
Natriumthiosulfat	Roth, D-Karlsruhe
Glutardialdehyd (~90 %)	Roth, D-Karlsruhe
Silbernitrat (≥99 %)	Roth, D-Karlsruhe
Formaldehyd	Merck, D-Darmstadt
Natriumcarbonat	Roth, D-Karlsruhe
EDTA (≥99 %)	Roth, D-Karlsruhe
Kalibrierlösung pH 4,66	Merck, D-Darmstadt
Kalibrierlösung pH 9,00	Merck, D-Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	Merck, D-Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, D-Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Roth, D-Karlsruhe
Natriumsulfat	Roth, D-Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, D-Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, D-Darmstadt
Neutralrot	Roth, D-Karlsruhe
Irgacure 2959	Ciba Specialty Chemicals, A-Basel
HDF-Zellen 8	Organesis, USA-Camden
Ready-Mix komplettiertes DMEM-Kulturmedium	Sigma, D-Deisenhofen
PBS	ICN, D-Eschwege
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, D-Karlsruhe
Dialysiermembranen (Spectra/Por) 12.000 -14.000 MWCO	Roth, D-Karlsruhe
Dialysiermembranen 100.000 Dalton	Roth, D-Karlsruhe
Dialysiermembranen 300.000 Dalton	Roth, D-Karlsruhe
Milliporemembranen 0,2 µm	Roth, D-Karlsruhe
Natriumazid	Roth, D-Karlsruhe
Acrylamid-/Bisacrylamid 30/08	Sigma-Aldrich, D-Schnelldorf

Tris-Puffer	Roth, D-Karlsruhe
APS	Sigma-Aldrich, D-Schnelldorf
TEMED	Roth, D-Karlsruhe
Eisessig	Roth, D-Karlsruhe
Magermilchpulver	Roth, D-Karlsruhe
PBS-Puffer	Roth, D-Karlsruhe
Tween 20	Roth, D-Karlsruhe
NUNC-Maxisorb Platten	VWR,
Kaliumcitrat	Roth, D-Karlsruhe
Polyclonal Antibody to Lysozym: HRP	Acris Antibodies, D-Hiddenhausen
TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)	Roth, D-Karlsruhe
Sigmamarker® Wide Range (MW 6,500-200.000 Da)	Sigma-Aldrich, D-Schnelldorf
Kaliumbromid	Sigma-Aldrich, D-Schnelldorf

Tab. 5: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Substanzen

3.2. Methoden und Geräte

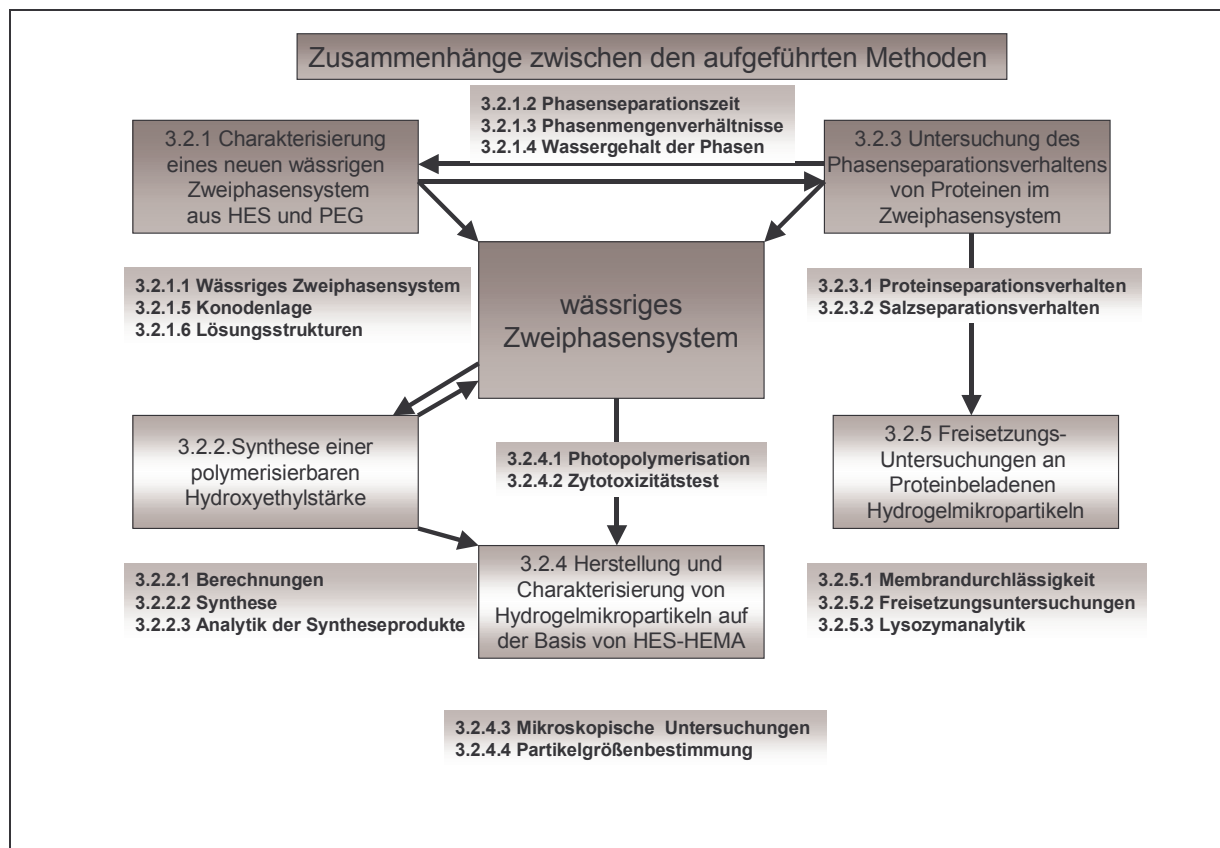


Abb. 8: Übersicht der Verknüpfung zwischen den verwendeten und entwickelten Methoden

Im diesem Abschnitt werden neu geschaffene und überarbeitete Verfahren für die Entwicklung von proteinbeladenen Hydrogelmikropartikel dargestellt. Die Abbildung 8 gibt

einen Überblick über die Verknüpfungsstellen dieser verschiedenen Methoden und deren Einordnung auf dem Weg zum Hydroxyethylstärkemikropartikel.

3.2.1 Charakterisierung eines neuen wässrigen Zweiphasensystemen aus HES und PEG

Im Rahmen dieser Arbeit war es von großem Interesse zu ermitteln, ob Hydroxyethylstärke die Fähigkeit besitzt in wässriger Lösung zusammen mit einem weiteren Polymer ein wässriges Zweiphasensystem auszubilden. Die nachfolgend beschriebenen Methoden dienen dazu dies herauszufinden und ein über die Bestimmung von Phasendiagrammen ermitteltes zweiphasiges System grundlegend zu charakterisieren. Dabei wurden im Rahmen dieser Untersuchungen die Phasenseparationszeit bestimmt, die Viskosität verschiedener Zweiphasiger und einphasiger Systeme ermittelt und eine Konodenbestimmung unter Berücksichtigung diverser Größen, wie Temperatur, Dichte, Konzentration und Molekularmasse.

3.2.1.1 Wässriges Zweiphasensystem aus HES und PEG

Für die Untersuchung der Phasenseparationseigenschaften von Systemen aus Polyethylenglykolen und Hydroxyethylstärken unterschiedlicher Kettenlänge wurde, ein Verfahren anhand der Methode von Albertsson [1] entwickelt. Dazu wurden 10 ml Hydroxyethylstärkestammlösung 30 % (w/w) in einem Becherglas vorgelegt und anschließend bis zum Entstehen einer beständigen Trübung mit der 40 % (w/w) Polyethylenglykolstammlösung titriert. Anschließend erfolgte eine Verdünnung des entstandenen Zweiphasensystems mit einer definierten Menge Wasser oder Puffer und wiederum die Titration. Dabei wurde für die Bestimmung des Phasendiagramms die Hydroxyethylstärken 130.000, 200.000 und 450.000, sowie die Polyethylenglykole 8.000 und 12.000 untersucht. Für die Bestimmung der Binodalkurven wurden Wasser oder isotonischer Natriumphosphatpuffer als Lösungsmittel eingesetzt (Ergebnisse siehe unter 4.1.1).

3.2.1.2 Bestimmung der Phasenseparationszeit

Die Ermittlung der Phasenseparationszeit erfolgte unter Verwendung eines neuen Messsystems dem optischen Transmissionsanalysator Lucina II (Optimags GmbH). Dieses Messgerät misst mittels pulsierend eingestrahlt Laserlichts die Veränderung der Laserlichtintensität durch die Probe (siehe Abb. 9). Die gemessene Veränderung der Laserlichtintensität ist durch Absorptions- und Streuungsprozesse bedingt. Damit ist es möglich, schon kleine Unterschiede in der optischen Dichte von Proben zu bestimmen [63].

Für die durchgeführte Versuchsreihe erfolgte die Herstellung definierter zweiphasiger Mischungen (siehe Tab. 6) von HES 130.000 / 200.000 / 450.000 mit PEG 12.000 oder mit PEG 8.000 in bidestilliertem Wasser. Eine gleichmäßige Art der Durchmischung wurde mit

Hilfe des Vortex auf höchster Stufe für 5 min bei Raumtemperatur erreicht. Für die Untersuchungen wurden jeweils zweiphasige Mischungen mit einem Gesamtvolumen von 15 ml hergestellt und in alkaliresistente Glasgefäße (C. Roth, D-Karlsruhe) eingebracht und vermessen.

PEG 8.000 bzw. 12.000 [%]	verschiedene HES in [%]
4	17,3
6	16
8	14,7

Tab. 6: Mischungsverhältnisse der untersuchten Zweiphasensysteme

Die Auswahl der Mischungsverhältnisse erfolgte mit Hilfe der zuvor erstellten Binodalkurven (siehe Abschnitt 4.1.1). Dazu wurden Mischungen im Bereich des Zweiphasensystems für die unterschiedlichen Kettenlängen von PEG und HES definiert und für alle nachfolgenden Untersuchungen verwendet. Die Probe wurde so lange messtechnisch analysiert bis keine Veränderung im System mehr feststellbar war.

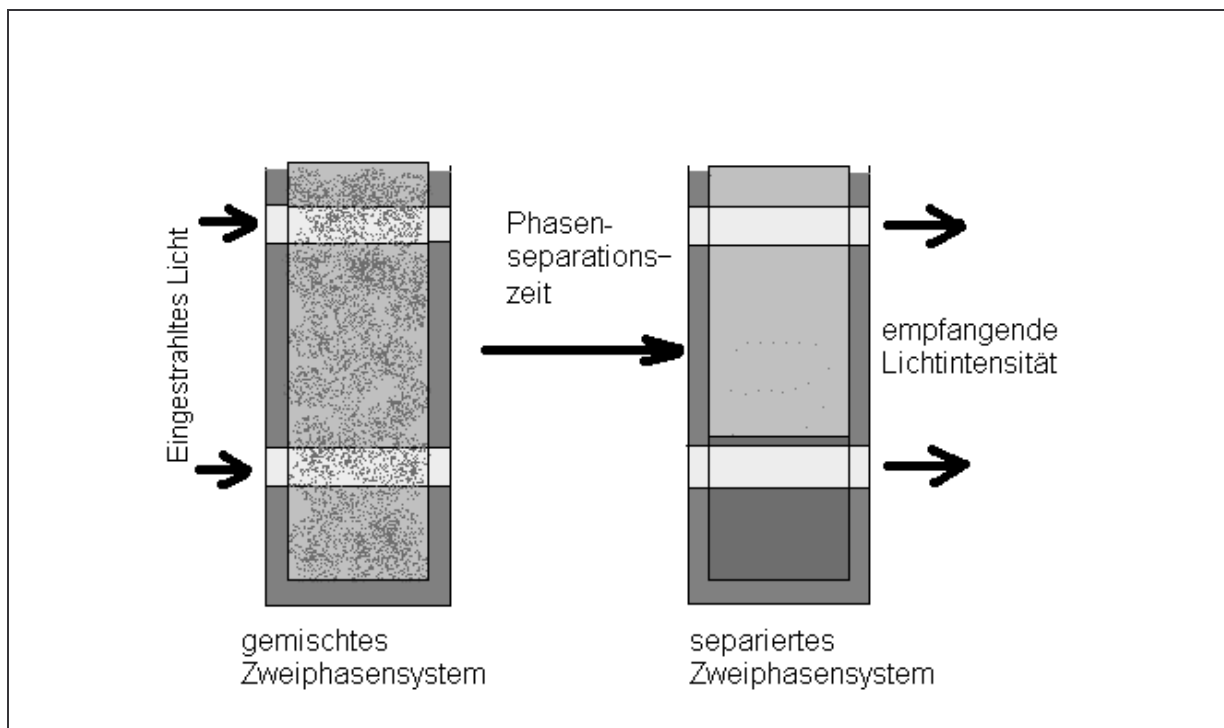


Abb. 9: Schematische Darstellung der Messapparatur zur Bestimmung der Phasenseparationszeit

Die Messung der Phasenseparationszeiten erfolgte, indem jeweils ein Laserdiodenpaar die Veränderungen im System im Bereich der entstehenden oberen Phase und unteren HES-reichen Phase messtechnisch erfasste (siehe Abb. 9). Dabei dient eine Laserdiode eines Paar als Detektor und die andere Diode als Empfänger. In der Abbildung 9 wird deutlich das sich Sender und Empfänger geometrisch unveränderbar an vorgegebenen Orten befinden. Durch diese Anordnung ist es mit diesem Messverfahren nicht möglich eine endgültige Phasenseparationszeit zu ermitteln. Der Endwert des oberen Signalweges wird beeinflusst

von Separations- und Sedimentationsvorgängen. Der untere Messwert beschreibt neben der Bildung einer separierten Phase auch sämtliche Entmischungsprozesse vor der abgeschlossenen Separation. Aus diesem Grund wurden die erhaltenen Ergebnisse streng getrennt nach oberen und unteren Kanal nur zur vergleichenden Analyse verschiedener HES-PEG- Zweiphasensysteme herangezogen.

In der Abbildung 10 ist die gemessene Veränderung der relativen optischen Dichte gegen die Zeit in Sekunden dargestellt für den oberen Messkanal. Aus der Darstellung ergibt sich keine klare Aussage. Für die Auswertung ist eine hinreichend exakte Bestimmung der Übergangszeiten des Trennprozesses notwendig. Die primären gemessenen Funktionen sind gekennzeichnet durch exponentiell abklingende Verläufe höheren Grades. Die dargestellten Verläufe weisen zu Beginn eine Todzeit auf und sind im weiteren Verlauf nicht durch einen einheitlichen Funktionstyp zu beschreiben. Da das Messverfahren nicht als durchgehend analog im Verlauf angesehen werden kann, ist es aufgrund des übergeordneten funktionellen Verhaltens eines Trenn- bzw. Separationsprozesses sinnvoll, die einzelnen Verläufe jeweils mit nur einer einfachen absteigenden Exponentialfunktion des Typs

$$U = U_0 + U_A * e^{\frac{-t}{\tau}} \quad (5)$$

zu beschreiben. Da die Funktion für $t \rightarrow \infty$ auf einen Grenzwert zuläuft, ist die gewünschte Aussage über die Phasenseparationszeit nicht durch eine Zeitmessung, sondern nur durch die näherungsweise Bestimmung der jeweiligen Zeitkonstante zu gewinnen.

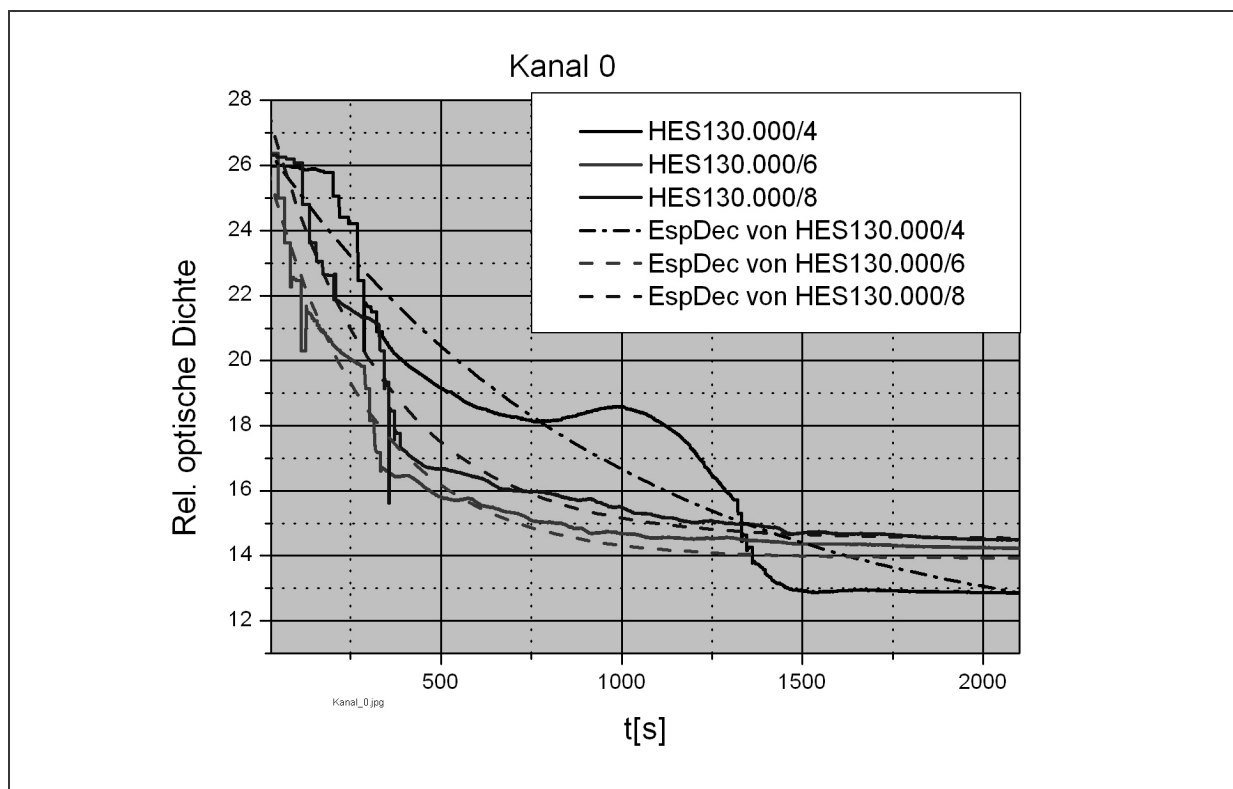


Abb. 10: Kurvenverläufe der gemessenen relativen optischen Dichte der Proben aufgetragen gegen die Zeit und die ermittelten Exponentialfunktionen(EspDec)

Für die Ermittlung der Zeitkonstante wurden die gemessenen Kurvenverläufe eines Kanals verschiedener Proben in ein gemeinsames Diagramm eingetragen, als e-Funktion nachgebildet und für diese gefitteten Verläufe die Zeitkonstanten τ bestimmt. Die ermittelten Zeitkonstanten τ wurden dann in einem Balkendiagramm vergleichend dargestellt.

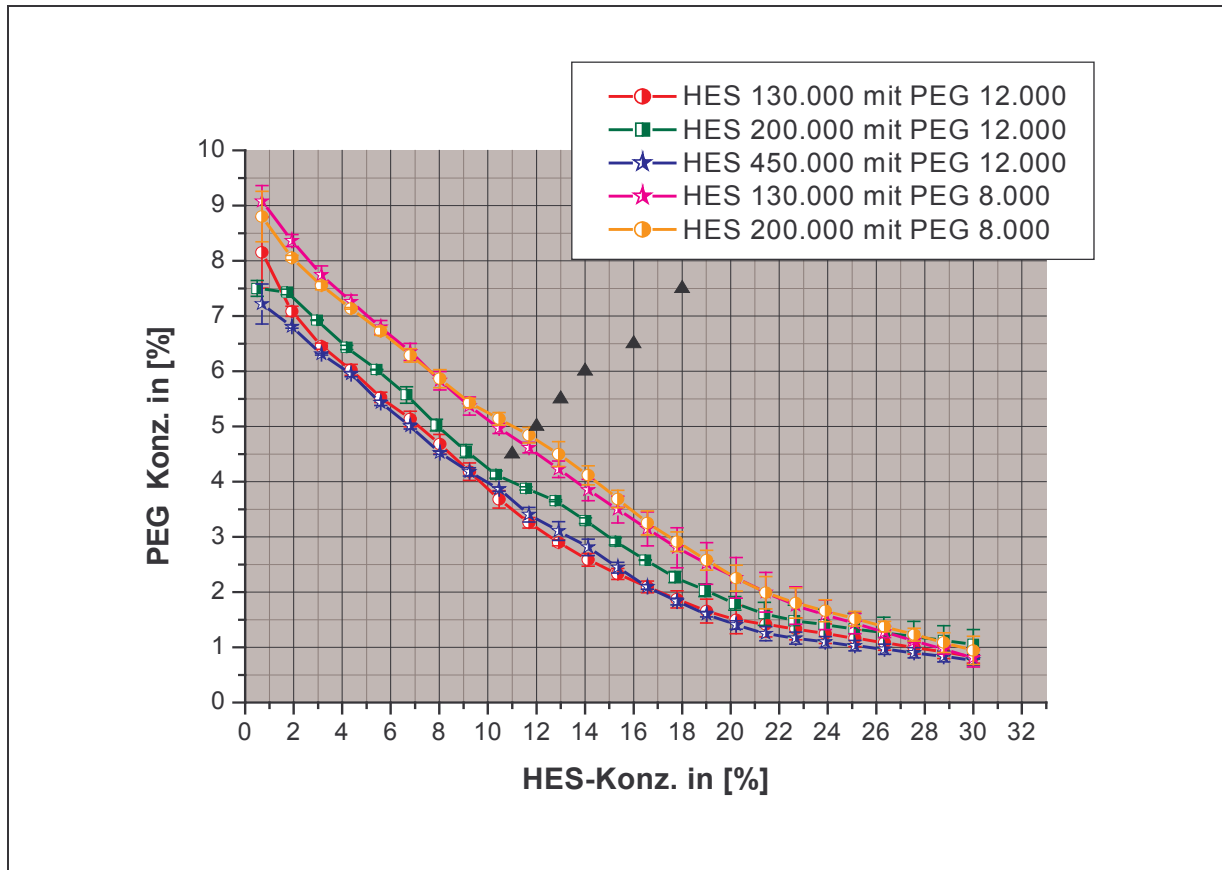


Abb. 11: definierte zweiphasige Mischungen anhand deren die Bestimmung der Konodenlage und weitere physikochemische Charakterisierungen erfolgten

3.2.1.3 Analyse der Phasenmengenverhältnisse

Für die Analyse der Phasenmengenverhältnisse der PEG und der HES Phase in zweiphasigen Mischungen erstellte man mit Hilfe der Binodalkurven definierte Probenzubereitungen (siehe Abb.11). Die im Diagramm durch schwarze Dreiecke markierten Zubereitungen zeigen die Zusammensetzung der verwendeten Mischungen an. Für die Untersuchungen verwendete man HES 130.000, 200.000 und 450.000 in Mischung mit PEG 8.000 oder 12.000. Das Phasenmengenverhältnis von PEG zu HES wurde definiert als die Masse der PEG-Phase m_{PEG} geteilt durch die Masse der HES-Phase m_{HES} :

$$\frac{m_{PEG}}{m_{HES}} \quad (6)$$

Die für die Systeme aus HES 200.000 bzw. 130.000 und PEG 8.000 oder 12.000 wurden fünf Proben zusammengestellt und gemischt. Für HES 450.000 wurden sechs zweiphasige

Mischungen hergestellt. Dazu wurden jeweils entsprechende Mengen einer 40 % HES-Stammlösung mit einer 24 % PEG-Stammlösung in Wasser bzw. Pufferlösung gemischt. Die Proben wurden nach dem Mischen in einer Spritze bis zur vollständigen Separation stehen gelassen. In mehreren Schritten konnten dann die beiden separierten Phasen sauber voneinander getrennt in zwei Probengefäße abgefasst werden. Die Massen der beiden Einzelphasen wurden mit Hilfe einer Analysenwaage (Satorius) ausgewogen.

3.2.1.4 Bestimmung des Wassergehaltes der separierten Einzelphasen

Für die Bestimmung des Wassergehaltes wurden wie bereits in Abschnitt 3.2.1.3 beschrieben definierte zweiphasige Mischungen mit Hilfe des Diagramms in Abbildung 11 hergestellt. Für die Zubereitung verwendete man eine 24 % PEG-Stammlösung (W/W) und eine 40 % HES-Lösung und verdünnte sie mit Wasser bzw. Puffer auf die entsprechenden Konzentrationsverhältnisse. Im Anschluss an die Separierung und die Trennung der Einzelphasen (siehe Abschnitt 3.2.1.3) entnahm man aus den Einzelphasen Proben zur Bestimmung des Trocknungsverlustes. Dazu wurden 1-2 g Probe in massenkonstante und ausgeheizte Gläschen mit 10 g getrocknetem Seesand eingewogen und durchmischt. Anschließend erfolgte die Trocknung der Proben im Trockenschrank bis zur Massenkonstanz. Der damit ermittelte Trocknungsverlust gab Aufschluss über die Menge an Wasser in der untersuchten Probenmasse und wurde entsprechend auf die gesamte Einzelphase hochgerechnet. Die Wiederfindungsrate von Wasser bei der angewandten Methode lag zwischen 100,3-102,4 Prozent. Die Wiederfindungsrate berechnete sich aus der tatsächlich eingesetzten Gesamtwassermasse, welche 100 % entspricht, im Vergleich zur messtechnisch ermittelten Gesamtwassermasse.

3.2.1.5 Bestimmung der Konodenlage

Stellt man eine zweiphasige Mischung her, so zerfällt diese in zwei korrespondierende Lösungen, deren Zusammensetzung durch Schnittpunkte auf der Binodalen gekennzeichnet ist [22]. Die Linie zwischen den beiden Schnittpunkten der Binodalen und der dazugehörigen Mischung nennt man Konode. Alle Mischungen die auf einer Konode liegen trennen sich in Phasen gleich bleibender Zusammensetzung mit variierenden Volumenverhältnissen.

Es gibt mehrere Möglichkeiten die Konodenlage für ein Zweiphasensystem zu bestimmen. Zum einen werden rheologische Methoden beschrieben, d.h. wenn zwei untersuchte Proben die gleiche Viskosität zeigen, geht man davon aus, dass es sich um zwei ähnlich zusammengesetzte Systeme handelt. Dazu wurden entsprechende Untersuchungen durchgeführt, welche zeigten, dass diese Methode zur Konodenfestlegung in wässrigen Zweiphasensystemen nicht anwendbar ist, da die Unterschiede der Viskositäten zwischen zwei wässrigen Phasen sehr gering sind.

Eine weitere Möglichkeit zur Ermittlung der Konodenlage ist die quantitative Bestimmung von mindestens zwei der drei Bestandteile der beiden entstehenden separierten Phasen. Die Bestimmung der Konodenlage von Zweiphasensystemen aus HES 130.000 und 200.000 mit PEG 12.000 bzw. 8.000 erfolgte analytisch, über die quantitative Bestimmung des Wassergehaltes (siehe Abschnitt 3.2.1.4) und der Analyse des Polyethylenglykolgehaltes der Einzelphasen.

Für die Bestimmung von Polyethylenglykol (PEG) in Gegenwart von HES wurde eine neue Methode entwickelt, die auf einer Farbreaktion des PEG's in saurer Bariumchlorid-Jod-Lösung basiert [64]. Für diese Reaktion wurden jeweils 0,2 ml einer PEG-haltigen Probe mit 1 ml 0,5 M Perchlorsäure versetzt und inkubiert. Anschließend versetzte man 0,8 ml dieser Probe mit 0,2 ml 5,0 % Bariumchloridlösung, um dann 0,1 ml 0,05 M Jodlösung dazuzugeben, zu schütteln und diese Mischung nach 5 min bei 535 nm UV-spektrometrisch zu vermessen.

Da die Proben neben PEG auch Hydroxyethylstärke enthielten, war es für die Vorbereitung des PEG-Nachweises notwendig, die Stärke enzymatisch abzubauen. Der Stärkeabbau sollte eine Störung der Nachweisreaktion verhindern [57, 65, 66].

Für die HES-Abbaureaktion wurden Proben der separierten Einzelphasen verdünnt. Dadurch reduzierten sich die Konzentrationen an enthaltenem PEG und HES. Durch die geringere Konzentration an HES wurde der Abbau mit Hilfe von Stärke spaltenden Enzymen erleichtert. Gleichzeitig sorgte die Verdünnung der Proben dafür, dass die PEG-Konzentration sich im optimalen Bereich für die Farbreaktion befand. Die PEG-reiche obere Phase wurde dazu mit 50 mM Natriumacetatpuffer (pH 5,0) 1:1000 (w/w) und die HES reiche untere Phase wurde 1:100 (w/w) mit 50 mM Natriumacetatpuffer verdünnt. Diese Verdünnungen versetzte man anschließend mit einer Enzymlösung A aus α -Amylase aus *Bacillus subtilis* im Verhältnis 1:1 (siehe Tab. 7) [57, 65]. Die Enzymlösung A bestand aus einer Mischung von 0,2 mg α -Amylase in 1 ml sterilem Natriumacetatpuffer pH 5,0 mit einem Zusatz von 40 ppm Calcium. Die Mischungen wurden im Wasserbad bei 55 °C für 24 -36 h inkubiert. Anschließend gab man weiteren Enzymlösungen B und C in die Proben und inkubierte diese Mischung weitere zwei Tage bei 50 °C. Bei der Enzymlösung B handelte es sich um eine Lösung von 0,2 mg / ml Pullulanase aus *Klebsiella pneumoniae* in Natriumacetatpuffer mit einem pH-Wert von 6,0 für eine bessere Stabilität des Enzyms bei Lagerung. Die Enzymlösung C enthielt eine Amyloglycosidase aus *Rhizopus* sp. mit 5000 Einheiten Enzym auf 1 g Feststoff. Dabei setzt eine Einheit Enzym in 3 min bei pH 4,5 und 55 °C 1,0 g Glucose aus einer Stärke frei. Für die Reaktion verwendete man eine Enzym-Natriumacetatpuffermischung mit einer Konzentration von 0,4 mg/ml und einem pH-Wert von 5,0.

Probenver- dünnung [μl]	Natriumacetat- puffer [μl]	Enzym A 1500 U/kg [μl]	Enzym B 100 U/kg [μl]	Enzym C 5000 U/kg [μl]
500	1200	0	0	0
500	700	500	0	0
500	300	500	400	0
500	0	500	400	300

Tab. 7: Enzymzusätze für enzymatischen Abbau und die Funktionsüberprüfung

Nach der insgesamt dreitägigen Probeninkubation im Wasserbad bei 50 °C wurden die Proben eingefroren oder direkt für die Farbreaktion und die anschließende spektrometrische Vermessung bei 535 nm präpariert.

3.2.2 Kapillarviskosimetrie

Die Lösungsstruktur von Makromolekülen ist abhängig vom Molekülaufbau und Moleküleigenschaften wie z.B. der Molmasse. Dabei ist der Molekülaufbau abhängig von der Anzahl der verknüpften Monomere, von der Art der Monomerverknüpfung, sowie von der Anzahl und Größe von eingefügten Substituenten und ausgebildeten Verzweigungen [67]. Des Weiteren ist die Lösungsstruktur abhängig von äußeren Bedingungen, wie dem verwendeten Lösungsmittel, der Temperatur und der eingesetzten Polymerkonzentration. Die Strukturen von Polymeren in Lösung sind häufig unregelmäßig und veränderlich. Unterschiedliche Ausformungen wie Kugeln, Knäule oder Stäbchen sind denkbar [68]. Deshalb ist es schwierig, eine Aussage über die Struktur eines Polymers in Lösung zu machen.

Will man trotzdem Aussagen zur Polymerlösungsstruktur treffen, so kann man die Gestalt eines Polymerknäuels über den Fadenendabstand und den Trägheitsradius beschreiben.

Dabei ist der Fadenendabstand die Entfernung des Anfangs- und des Endes der Polymerkette im zeitlichen Mittel. Der Trägheitsradius R_G ist eine messtechnisch ermittelbare Größe, welche sich für beliebige Teilchenformen angeben lässt.

Fadenendabstand:
$$\sqrt{h^2} \quad (7)$$

Trägheitsradius R_G :
$$R_G = \left(\frac{\sum m_i \cdot r_{i2}^2}{\sum m_i} \right)^{1/2} \quad (8)$$

Bestehen keine Wechselwirkungen zwischen Polymer und Lösungsmittel, auch Thetazustand genannt, gibt es zwischen Trägheitsradius R_G und Fadenendabstand $\sqrt{h^2}$ eine Beziehung:

$$R_G^2 = \frac{1}{6} h^2 \quad (9)$$

Der Trägheitsradius R_G hängt über die sogenannte R_G - M - Beziehung mit der Molmasse M zusammen.

$$R_G = k_R \cdot M^\nu \quad (10)$$

Sind die Werte für den Trägheitsradius R_G und für die Molmasse M bekannt, kann man über den Exponenten ν eine Aussage über die Lösungsstruktur des entsprechenden Polymers machen, was durch eine einzige Gelpermeationschromatographie-Messung (GPC) möglich ist [51].







Ist der Trägheitsradius nicht bekannt besteht die Möglichkeit den Zusammenhang zwischen charakteristischen Polymergrößen und der Lösungsstruktur über die Mark-Houwink-Sakurada-Beziehung zu bestimmen.

$$[\eta] = k_\eta \cdot M^a \quad (11)$$

Durch viskosimetrische Messungen wird der Staudinger-Index $[\eta]$ bzw. die intrinsische Viskosität ermittelt. Der Exponent a beschreibt die Aufweitung des Moleküls und kann Werte zwischen 0 (kompakte Kugel) bis 2 (Stäbchen) annehmen (siehe Tab. 8). Die Konstante k_η muss experimentell ermittelt werden. Dabei erfolgt die Bestimmung der Konstante über den Mark- Houwink Plot.

Bei bekannter R_G - M -Beziehung ist die Berechnung des Exponenten a möglich [68].

$$a = 3 \cdot \nu - 1 \quad (12)$$

Geometrie	a	ν	
kompakte Kugel	0	0,33	
Polymerknäuel im Theta-Zustand	0,5	0,5	
teilweise gestreckt	$0,5 < a < 1$	$0,5 < \nu < 0,66$	
vollständig gestreckt	1	0,67	
halbflexibles Stäbchen	$1 < a < 2$	$0,67 < \nu < 1$	
Stäbchen	2	1	

Tab. 8: Molekülgeometrie

Die Viskosimetrie ist eine klassische Methode zur Charakterisierung von Polymeren in Lösung, z.B. zur Bestimmung der hydrodynamischen Moleküleigenschaften gelöster Polymere [68]. Bei linearen Molekülen lässt sich empirisch eine Beziehung zwischen der Lösungsviskosität und der Molmasse M herstellen. Nach Einstein hängt dabei in einer verdünnten Lösung die durch die gelöste Probe bewirkte relative Viskositätserhöhung η_{rel} nur

vom Volumenanteil der gelösten Probe Φ ab, dabei wird die Dichte des Polymerknäuls von $\rho_{\text{äqu}}$ beschrieben und c entspricht der Polymerkonzentration.

$$\eta_{\text{rel}} = \frac{\eta_{\text{Misch.}}}{\eta_{\text{Lösungsmittel}}} = 2,5 \cdot \Phi + 1 \quad \text{mit} \quad \Phi = \frac{c}{\rho_{\text{äqu}}} \quad (13)$$

Für die spezifische Viskosität η_{spez} ergibt sich folgender Zusammenhang.

$$\eta_{\text{spez}} = \eta_{\text{rel}} - 1 \quad (14)$$

Durch Extrapolieren der experimentell bestimmten spezifischen Viskosität η_{spez} geteilt durch die Polymerkonzentration c (η_{spez}/c) gegen $c = 0$ und $\gamma = 0$ erhält man für die wechselwirkungsfreien Teilchen eine Größe, die als Maß für die Volumenbeanspruchung des Einzelmoleküls angesehen wird und zwar die Intrinsische Viskosität $[\eta]$.

$$\lim_{\substack{c \rightarrow 0 \\ \gamma \rightarrow 0}} \frac{\eta_{\text{spez}}}{c} = [\eta] \quad (15)$$

Nach der Theorie von Huggins besteht im Bereich ideal verdünnter Lösungen der folgende lineare Zusammenhang zwischen η_{spez}/c und c .

$$\frac{\eta_{\text{spez}}}{c} = [\eta] + k_H \cdot [\eta]^2 \cdot c \quad (16)$$

Für die Ermittlung der intrinsischen Viskosität bietet sich die Kapillarviskosimetrie an. Dabei wird die Zeit verglichen die eine Polymerlösung im Vergleich zum reinen Lösungsmittel braucht, um durch eine Kapillare definierter Größe zu fließen. Dabei ist die Durchflusszeit t proportional zur Viskosität der Lösung η und indirekt proportional zur Dichte ρ .

$$t_{\text{Lösungsm.}} = \frac{\eta_{\text{Lösungsm.}}}{\rho_{\text{Lösungsm.}}} \quad (17)$$

$$t_{\text{Misch.}} = \frac{\eta_{\text{Misch.}}}{\rho_{\text{Misch.}}} \quad (18)$$

Die relative Viskosität η_{rel} wird als das Verhältnis der Viskosität der Polymerlösung zur Viskosität des Lösungsmittels $\eta_{\text{Misch.}} / \eta_{\text{Lösungsm.}}$ definiert (13). Für die meisten Polymerlösungen gilt in den interessanten Konzentrationsbereichen, dass das Verhältnis der Dichten $\rho_{\text{Misch.}} / \rho_{\text{Lösungsm.}} \approx 1$. Dadurch ergibt sich als mathematische Annäherung, die relative Viskosität η_{rel} als einfaches Zeit- Verhältnis.

$$\eta_{\text{rel}} = t_{\text{Misch.}} / t_{\text{Lösungsm.}} \quad (19)$$

Will man die spezifische Viskosität ermitteln, so wird diese als anteilige Änderung der Viskosität η bei der Zugabe von Polymer definiert.

$$\eta_{\text{spez}} = \frac{\eta_{\text{Misch.}} - \eta_{\text{Lösungsm.}}}{\eta_{\text{Lösungsm.}}} \quad (20)$$

Die spezifische Viskosität lässt sich über die Menge an gelöstem Polymer in die reduzierte Viskosität umrechnen (21).

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{spez}}{c} \quad (21)$$

Sowohl die relative Viskosität η_{rel} (19) als auch die reduzierte Viskosität η_{red} (21) sind abhängig von der Polymerkonzentration.

Für die Ermittlung der Volumenbeanspruchung der verwendeten Polymere wird die intrinsische Viskosität über die spezifische oder die relative Viskosität grafisch ermittelt. Dazu dient zum einen der Huggins- oder der Kramer-Plot. Beim Huggins-Plot erfolgt eine Extrapolation auf den Wert bei dem die Funktion η_{spez}/c aufgetragen gegen die Polymerkonzentration c die y-Achse schneidet (siehe Abb.12). Alternativ ist die intrinsische Viskosität $[\eta]$ auch ermittelbar über die Extrapolation einer Funktion gegen Null, bei welcher der natürliche Logarithmus der relativen Viskosität η_{rel} geteilt durch die Konzentration c aufgetragen gegen die Polymerkonzentration, dieses Verfahren nennt sich auch Kramer Plot.

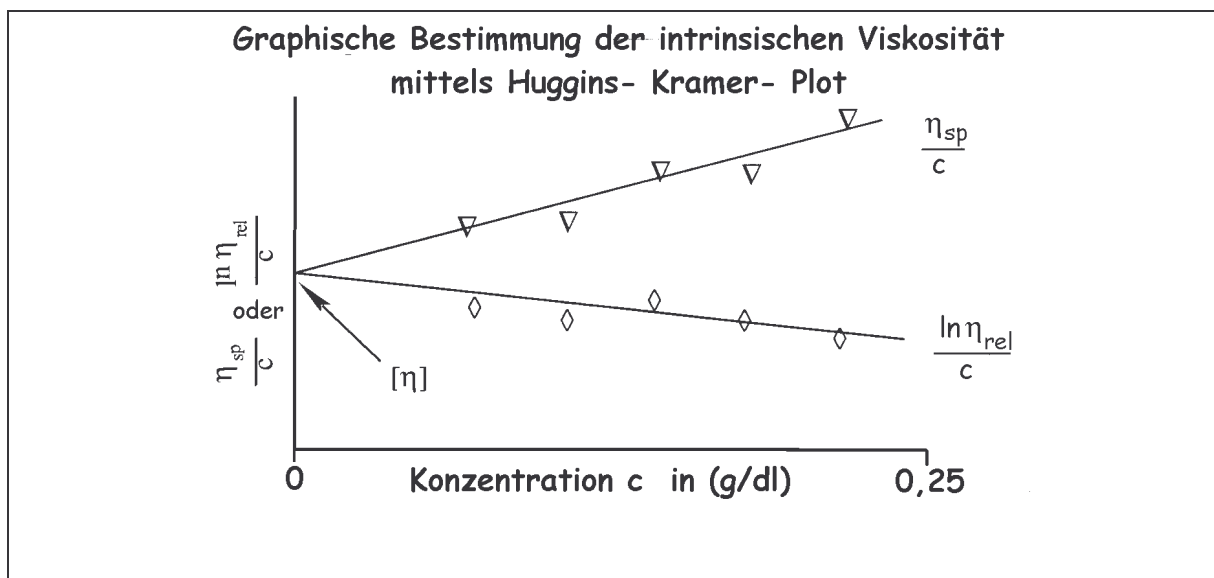


Abb. 12: Huggins und Kramer Plots [69]

Mit Hilfe der intrinsischen Viskosität und bei Kenntnis der Molekularmasse M kann man dann über die Mark-Houwink-Sakurada-Beziehung Rückschlüsse auf die Lösungsstruktur des untersuchten Polymers ziehen [70].

$$[\eta] = k_{\eta} \cdot M^a \quad (22)$$

Bei den Größen k_{η} und a handelt es sich um so genannte Mark-Houwink Konstanten, welche die Abhängigkeiten der intrinsischen Viskosität des Polymers von der Molekülgeometrie, vom Lösungsmittel und von Temperatureinflüssen beschreiben. Der Exponent a beschreibt die Molekülgeometrie und kann grafisch ermittelt werden. Dazu werden experimentell die intrinsischen Viskositäten verschiedene Molekulargewichtsfractionen eines Polymers bestimmt. Diese intrinsischen Viskosität werden logarithmiert $\log [\eta]$ und gegen den

Logarithmus der dazugehörigen Molekülmasse $\log [M]$ in einem Diagramm aufgetragen. Das dazugehörige Diagramm zeigt dabei meistens eine Gerade. Die Steigung dieser Gerade wird charakterisiert durch die Konstante a und der Schnittpunkt mit der y-Gerade entspricht dem dekadischen Logarithmus der Konstante k_η (siehe Abb. 13).

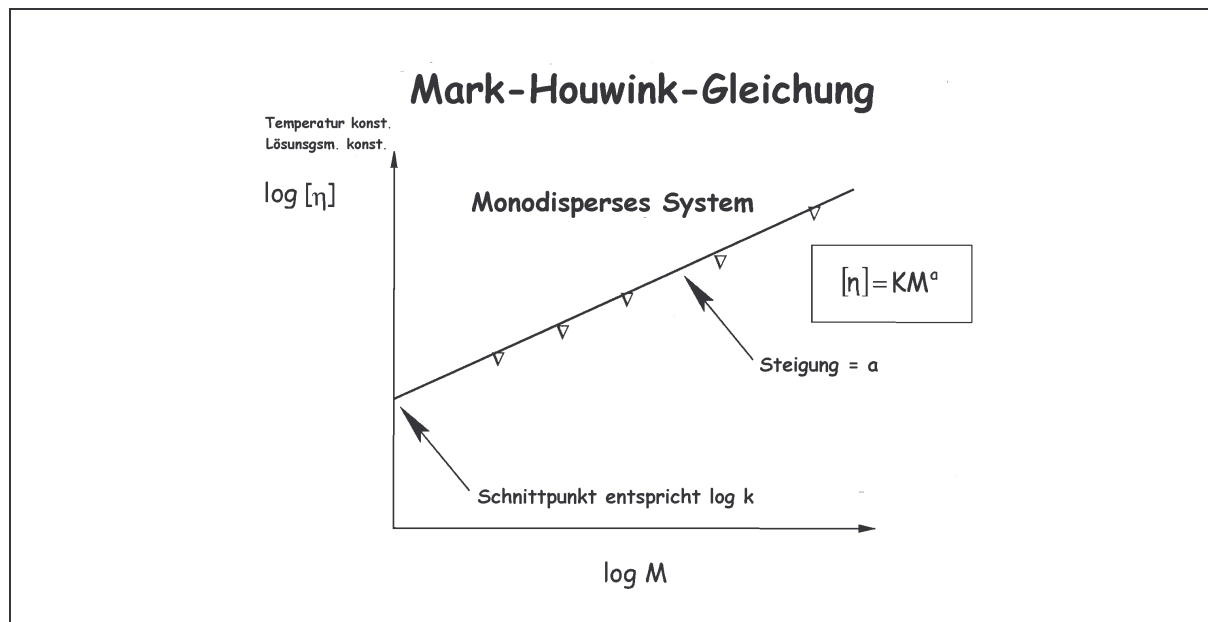


Abb. 13: Mark-Houwink-Plot [69]

Für die viskosimetrische Messung wurde ein automatisches Ubbelohde Kapillarviskosimeter verwendet. Die Proben wurden staubfrei mit deionisiertem, filtriertem Wasser (Milliporefilteranlage) hergestellt. Für die Messung wurden 15 ml filtrierte Stammlösung in das Kapillarviskosimeter eingefüllt und anschließend mit definierten Volumina an deionisiertem, filtriertem Wasser automatisch verdünnt. Die Kapillare wurde mit einer Mischung aus 1/3 30 % Wasserstoffperoxid und 2/3 konz. Schwefelsäure (96 %) vorbereitet. Zuerst erfolgte die Bestimmung des Wasserwertes für das verwendete Wasser bei 20 °C. Anschließend erfolgte die Vermessung der temperierten Proben bei 20 °C. Die ermittelten Durchflußzeiten für die Probenverdünnungen von HES 130.000, 200.000 und 450.000, sowie PEG 6.000, 8.000 und 12.000 wurden mit der Hagenbachkorrektur korrigiert und anschließend mit Hilfe des Wasserwertes und den oben beschriebenen mathematischen Verfahren umgerechnet in die relative, spezifische und reduzierte Viskosität. Unter Verwendung des Huggins- und des Kramer-Plots ermittelte man die intrinsische Viskosität der einzelnen Polymerproben. Anschließend bestimmte man den Exponent a zur Beschreibung der Lösungsstruktur des Polymers über das Erstellen jeweils eines Mark-Houwink-Plot für HES und für PEG.

3.2.3 Untersuchung des Phasenseparationsverhaltens von Proteinen im Zweiphasensystem

Die Untersuchung des Phasenseparationsverhaltens von Proteinen in wässrigen Zweiphasensystemen aus HES 200.000 und PEG 12.000 wurde unter Verwendung von Lysozym als Modellprotein durchgeführt. Anschließend überprüfte man die für das Lysozym ermittelten Ergebnisse mit einem weiteren Protein dem Bone-morphogenetic-Protein-2 (BMP-2) Dabei diente diese Untersuchung dazu Einflussfaktoren auf die Proteinseparation zu ermitteln, um damit Steuerungsmöglichkeiten für die Anreicherung von Proteinen in der Hydroxyethylstärkephase zu finden.

3.2.3.1 Bestimmung des Lysozymgehaltes im Zweiphasensystem

Die quantitative Bestimmung des Lysozyms in den separierten Einzelphasen der untersuchten Zweiphasensysteme erfolgte mit einem unspezifischen Proteinnachweis und zwar der Färbung des Proteins mit Coomassie-Blue.

Dazu löste man für die Herstellung des Bradford-Reagenz 100 mg Coomassie Brilliant Blue (G-250) in 50 ml unvergälltem Ethanol (95 %), gegebenenfalls unter Verwendung eines Bandelin Sonotex Ultraschalbads. Die entstehende Lösung wies eine blaue Färbung auf. Zu dieser Lösung wurden 100 ml 85 % Phosphorsäure gegeben, worauf sich die Farbe der Lösung in rotbraun änderte. Diese Mischung füllte man anschließend mit Wasser auf 1l auf und der Farbton der Lösung änderte sich erneut ins bläuliche. Die Lösung muss über eine Nacht im Kühlschrank stehen. Anschließend ist sie verwendbar und wurde vor der Anwendung filtriert. Die Kontrolle der Farbveränderung der Lösung dient als Hinweis für die Herstellung eines funktionsfähigen Bradfordreagenz.

Für den Proteinnachweis pipettierte man jeweils 20 µl Probe oder reine Pufferlösung (Blindwert) auf eine 24iger Platte und versetzte diese mit 1 ml Bradfordreagenz. Anschließend wurden die Proben 3 min im Plattenreader Biotec Power Wave XS geschüttelt und bei einer Wellenlänge von 595nm vermessen. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte mit der Software KC4. Der optimale Konzentrationsbereich von Lysozym mit dieser Nachweismethode lag bei 25 µg / ml - 500 µg / ml.

3.2.3.2 Ermittlung des BMP-2 Gehaltes im Zweiphasensystem

Für die quantitative Bestimmung des separierten BMP-2-Mengen im Zweiphasensystem verwendete man ein Verfahren basierend auf einer Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 3.2.6.3.1) und einer angepassten Silverstain-Gel-Färbung [71].

Die Nachweisgrenze des durchgeführten Silverstain-Test lag bei 10 ng pro Bande. Die für die Elektrophorese verwendeten Gele wurden wie in Abschnitt 3.2.6.3.1 hergestellt. Anschließend mischte man die aus den separierten Einzelphasen entnommenen Proben mit

dem vierfach konzentrierten Probenpuffer im Verhältnis 30 µl Probe zu 10 µl Puffer. Dann wurden 10 µl und 5 µl dieser Proben-Puffer-Mischung, eine Kontrolllösung mit BSA und ein Molekulargewichtsstandard aufgetragen und die Elektrophorese mit 75 V im Sammelgel und 175 V im Trenngel gestartet. Für die Gelfärbung stellte man verschiedene Lösungen her (siehe Tab. 9). Dabei wurde jedes Gel in ca. 50 ml der aufgeführten Lösungen eingelegt und über den in der Tabelle angegebenen Zeitraum kontinuierlich in der Mischung bewegt (siehe Tab. 9).

Lösung Nr.	Inhaltsstoffe	Färbung unter Schütteln	Zusammensetzung
1	Ethanol 30 % Essigsäure 10 %	30 min oder über Nacht zum fixieren	30 ml Ethanol 10 ml Essigsäure 60 ml Wasser
2	Ethanol 30 % 0,5 M Natriumacetat 0,2 % Natriumthiosulfat 0,5 % Glutardialdehyd	30 min	30 ml Ethanol 50 ml 0,5 M Natriumacetat 2 ml Natriumthiosulfat 16 ml Wasser 2 ml Glutardialdehyd (25 %)
3	Wasser	dreimal mit Wasser waschen	je 10 ml Milliporewasser filtriert
3	0,1% Silbernitrat 0,01 % Formaldehyd	15 min zum Färben	10 ml Silbernitrat 30 µl Formaldehyd 90 ml Wasser
4	2,5 % Natriumcarbonat 0,01 % Formaldehyd	5 min zum Entwickeln, gestoppt wird nach Bedarf	12,5 ml Natriumcarbonat 30 µl Formaldehyd 87,5 ml Wasser
5	0,5 M EDTA		10 ml EDTA 90 ml Wasser

Tab. 9: Lösungen für die Silverstainfärbung

Nach erfolgter Silverstainfärbung wurden die Gele in Wasser gelagert, in Folie eingeschweißt und für die weitere Auswertung anschließend eingescannt.

3.2.3.3 Untersuchung des Phasenseparationsverhalten von Proteinen bei unterschiedlichen pH-Werten und unter Verwendung von verschiedenen Puffersystemen

Im Rahmen der Analyse des Phasenseparationsverhaltens von Lysozym im wässrigen Zweiphasensystem aus HES 200.000 MS 0,5 und PEG 12.000 untersuchte man, welchen

Einfluss die Variation des pH-Wertes oder die Verwendung verschiedener Puffersalze auf die Proteinseparation hat.

Die Bestimmung der Lysozymkonzentration in den Einzelphasen erfolgte mittels der unter 3.2.3.1 beschriebenen Bradfordmethode. Proben die BMP-2 als Protein enthielten wurden mit der Methode aus Abschnitt 3.2.3.2 analysiert. Für die Mischung setzte man 0,3 g PEG-Stammlösung (24 %) mit 0,3 g HES- Stammlösung (40 %) und 0,4 g Lysozymlösung (0,1 mg/ml) ein, wobei man entweder bidestilliertes Wasser oder eine Puffersalzlösung als wässrige Basis einsetzte.

Die Einzelkomponenten wurden in eine Spritze eingewogen, gemischt und nach erfolgter Separation in die beiden Einzelphasen getrennt in Glasgefäße mit Deckel abgefüllt.

Für die Herstellung der Puffersalzlösungen verwendete man die in Tabelle 10 dargestellten Salze in den aufgeführten Konzentrationen. Die pH-Werte wurden Hilfe des pH-Meters LS 13320 (WTW GmbH, D-Weilheim) gemessen und gegebenenfalls durch Verwendung der zum Salz gehörigen Säure oder Base auf den gewünschten pH-Wert eingestellt (siehe Tab. 10). Vor jeder Messserie wurde das Messgerät mit zwei Standardpufferlösungen pH 4,66 und pH 9,00 (Merck) kalibriert. Die für die Untersuchungen verwendeten pH-Werte und Salzkonzentrationen sind ebenfalls der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Medium	pH-Wert	Salzkonzentration
bidestilliertes Wasser	6,3	
Natriumacetatpuffer	5,0 oder 7,00	20 mM oder 50 mM oder 100 mM
Kaliumphosphatpuffer	7,0	20 mM oder 50 mM oder 100 mM
Natriumphosphatpuffer	7,0	20 mM oder 50 mM oder 100 mM
Natriumhydrogencarbonatpuffer	8,0 oder 8,5	20 mM oder 50 mM oder 100 mM
Natriumsulfat	7,0	20 mM oder 50 mM oder 100 mM
Natriumchlorid	7,0	20 mM oder 50 mM oder 100 mM
Kaliumchlorid	7,0	20 mM oder 50 mM oder 100 mM

Tab. 10: Verwendete Medien für die Analyse des Puffereinflusses auf die Proteinseparation

Bei der Arbeit mit dem Protein BMP-2 reduzierte man die verwendeten Puffer auf ausgewählte Systeme. Untersucht wurden 20 mM Natriumphosphatlösung pH 7,0, sowohl mit als auch ohne Zusatz von 20 mM Natriumsulfat, sowie ein 20 mM Natriumacetatpuffer pH 5,0.

3.2.3.4 Separationsverhalten der verwendeten Puffersalze im Zweiphasensystem in Abhängigkeit von der Salzkonzentration und dem pH-Wert

Im Anschluss an die Untersuchungen zum Separationsverhalten von Proteinen im wässrigen Zweiphasensystem aus HES 200.000 und PEG 12.000 stellte sich die Frage, ob die verwendeten Puffersalze sich ebenfalls unterschiedlich in den beiden sich bildenden Phasen anreichern. In der nachfolgenden Tabelle ist die verwendete Salzmenge mit aufgeführt für die Herstellung der entsprechenden Puffersalzlösungen. Im Vergleich zu den Untersuchungen an den Proteinen wurden verschiedene pH-Werte weggelassen bzw. ergänzt.

Medium	Konz in mM	pH-Wert	Mischung
Natriumacetatpuffer	20	5,00	164,08 mg in 100 ml bidest. Wasser
	50	5,00	410,2 mg in 100 ml bidest. Wasser
	100	5,00	820,4 mg in 100 ml bidest. Wasser
Natriumacetatpuffer	20	7,00	164,08 mg in 100 ml bidest. Wasser
	50	7,00	410,2 mg in 100 ml bidest. Wasser
	100	7,00	820,4 mg in 100 ml bidest. Wasser
Natriumdihydrogenphosphat monohydrat	20	7,00	275,98 mg in 100 ml bidest. Wasser
	50	7,00	689,95 mg in 100 ml bidest. Wasser
	100	7,00	1379,9 mg in 100 ml bidest. Wasser
Kaliumhydrogenphosphat	20	7,00	272,18 mg in 100 ml bidest. Wasser
	50	7,00	680,45 mg in 100 ml bidest. Wasser
	100	7,00	1360,9 mg in 100 ml bidest. Wasser
Natriumsulfat	20	7,00	284,08 mg in 100 ml bidest. Wasser
	50	7,00	710,2 mg in 100 ml bidest. Wasser
	100	7,00	1420,4 mg in 100 ml bidest. Wasser
Natriumchlorid	20	7,00	116,88 mg in 100 ml bidest. Wasser
	50	7,00	292,2 mg in 100 ml bidest. Wasser
	100	7,00	584,4 mg in 100 ml bidest. Wasser
Kaliumchlorid	20	7,00	149,08 mg in 100 ml bidest. Wasser
	50	7,00	372,71 mg in 100 ml bidest. Wasser
	100	7,00	745,42 mg in 100 ml bidest. Wasser

Tab. 11: Untersuchte Pufferlösungen bezüglich ihres Separationsverhaltens

Für die Untersuchung des Separationsverhaltens der eingesetzten Puffersalze wurden Zweiphasensysteme unter Verwendung der in Tabelle 11 aufgeführten Salze hergestellt. Als Blindwert diente ein Zweiphasensystem mit bidestillierten Wasser als Lösungsmittel. Unter Verwendung der verschiedenen Puffer oder des Wassers als Lösungsmittel stellte man

Stammlösungen mit 24 % (w/w) HES 200.000 und 40 % (w/w) PEG 12.000 her. Diese Stammlösungen mischte man dann in einem Verhältnis von 3,0 g HES- Lösung zu 3,0 g PEG- Lösung und zu 4,0 g Lösungsmittel in einer Spritze und ließ die Phasen separieren. Anschließend trennte man die separierten Einzelphasen voneinander. Aus den so gewonnenen Einzelphasen nahm man dann die Proben für weitere Untersuchungen, wie Leitfähigkeitsmessungen, Dichtebestimmungen und rheologische Messungen.

Die Leitfähigkeitsmessungen (Konduktometrie) der Einzelphasen erfolgten im Vergleich mit dem salzfreien wässrigen Zweiphasensystem. Für diese konduktometrischen Untersuchungen verdünnte man eine definierte Probenmasse 1:10 mit bidestilliertem Wasser. Die Messung führte man mit einem Leitfähigkeitsmessgerät Microprocessor Conductivitymeter LF 539 (WTW GmbH, D-Weilheim) durch.

Die Messung der Dichten der separierten Einzelphasen erfolgte mit dem Dichtemesser DMA 46 (Anton Paar, A- Graz) bei 20 °C. Für die Messung werden jeweils 10 ml Probenlösung eingesetzt. Die Kalibrierung des Gerätes erfolgte durch Messung von bidestilliertem Wasser und Luft.

Für die rheologischen Untersuchungen verwendete man das Rheometer vom Typ CVO 50 (Bohlin Instruments, D-Pforzheim). Dazu wurde die Probe bei Raumtemperatur in das Messgerät eingebracht und oszillatorisch vermessen bei 20°C. Verwendet wurde eine Kegel-Platte-Einrichtung CP 1°/40 mm mit einem Kegelöffnungswinkel von 1°. Der Plattendurchmesser betrug 40 mm. Es wurde ein Tropfen Lösung auf die Platte aufgebracht. Anschließend wurden bei einer Frequenz von 1,5 Hz und einer Schubspannung von 50 Pa 10 Messwerte bestimmt und grafisch ausgewertet.

3.2.4 Synthese einer polymerisierbaren Hydroxyethylstärke (HES) und deren Charakterisierung

In diesem Abschnitt werden die verwendeten Ausgangsberechnungen und Methoden zur Herstellung einer derivatisierten Hydroxyethylstärke über die Verknüpfung mit Hydroxyethylmethacrylat und die für die analytische Betrachtung eingesetzten Verfahren beschrieben. In der Synthese wird Hydroxyethylstärke mit einer definierten Menge an mit Carbonyldiimidazol (CDI) aktiviertem Hydroxyethylmethacrylat (HEMA-CI) versetzt.

3.2.4.1 Berechnungen für die Synthese von mit Hydroxyethylmethacrylat verknüpfter Hydroxyethylstärke (HES-HEMA)

Vor der Durchführung der Synthese von HES-HEMA wurde berechnet, welche Mengen an Hydroxyethylmethacrylimidazolylcarbammat (HEMA-CI) hergestellt werden müssen, um eine

ausreichende Menge der Zwischenstufe für eine definierte Umsetzung mit der für die Synthese verwendeten Hydroxyethylstärke 200.000 vorliegen zu haben. Die Berechnung erfolgte über das Molekulargewicht unsubstituierter Glucopyranoseeinheiten und dem Molekulargewicht von Glucopyranoseeinheiten mit einer Hydroxyethylfunktion. Entsprechend den Herstellerangaben zum Substitutionsgrad der verwendeten Hydroxyethylstärken wurden die einzelnen Bausteine in der Berechnung berücksichtigt.

Berechnungsbeispiel der benötigten HEMA-Cl Menge für ein molares Verhältnis von HEMA-Cl zu einer hydroxyethylierten Glucopyranoseeinheit von 0,25:1, das bedeutet jede vierte Glucopyranoseeinheit soll substituiert werden können. Die Berechnung erfolgte in diesem Beispiel für eine Hydroxyethylstärke 200.000 mit einem molaren Substitutionsgrad von 0,4-0,55.

$$M_{\text{HEMA-Cl}} = 224 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

$$M_{(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)} = 161,0 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

$$M_{(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)+1\text{H}} = 162,0 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

$$M_{\text{Hydroxyeth}} = 45,0 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

$$M_{\text{SubstPGRGr}} = 206,0 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Geht man bei der betrachteten Stärke von einer molaren Substitution (MS) von 0,4 aus, d.h. von 10 Glucoseeinheiten sind 4 substituiert, dann ergibt sich rechnerisch:

$$206 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot 0,4 + 162,0 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot 0,6 = \underline{179,6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}} \text{ als Mittleres Molekulargewicht}$$

Der Einsatz von 10,0 g HES mit $M_{0,4\text{HES}} = 179,6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ entspricht 0,056 mol.

HEMA-Cl mit einem molaren Anteil für die Substitution $0,25 \cdot 0,056 \text{ mol} = 0,014 \text{ mol}$, was einer Menge von 3,12 g entspricht.

Typ HES	MS HES	$M_{0,5\text{HES}}$	Molares Verhältnis HEMA-Cl : deriv. Gluc.	$m_{\text{HEMA-Cl}}$ 100 % [g]	m_{HES} [g]
200.000	0,5	$184,0 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$	0,25 : 1	60,86	200,00
200.000	0,5	$184,0 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$	0,4 : 1	4,87	10,00

Tab. 12: Verwendete Massenanteile von HES und HEMA-Cl für die Synthese

In der oben stehenden Tabelle 12 sind entsprechenden benötigten HEMA-Cl Mengen für die Verwendung einer Hydroxyethylstärke mit einer molaren Substitution von 0,5 aufgeführt. Dabei wurde die Menge an HEMA-Cl für die Substitution jeder 4 (MS 0,25) bzw. jeder 2,5 (MS 0,4) Glucoseeinheit der Hydroxyethylstärke berechnet in Abhängigkeit von der eingesetzten HES- Menge.

3.2.4.2 Synthese von HES-HEMA

Die Synthese einer mit Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) verknüpften HES erfolgte in zwei Schritten. Im ersten Schritt wurde das HEMA aktiviert durch die Reaktion von HEMA mit Carbonyldiimidazol (siehe Abb. 14).

Dazu löste man 40,5 g (0,25 mol) Carbonyldiimidazol (CDI, 98 %, Merck) in 375 ml trockenem und stickstoffbegasten Tetrahydrofuran (THF, wasserfrei) unter Stickstoffatmosphäre. Zum herstellen einer klaren Lösung erwärmte man die Zubereitung in Intervallen mit einem Fön (max. 40°C). Anschließend wurde unter Rühren, mit einer Spritze 30,34 ml HEMA in die abgekühlte Mischung gegeben. Die Zubereitung reagierte in einem Zweihalsrundkolben unter konstantem Rühren, lichtgeschützt und unter Stickstoffbegasung 16 h lang bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der Mischung eine Spatelspitze Hydrochinonmonomethylether (>99 %, Merck) zugesetzt. Die Lösungsmittelabtrennung erfolgte unter Vakuum bei 40°C mittels Rotavapor.

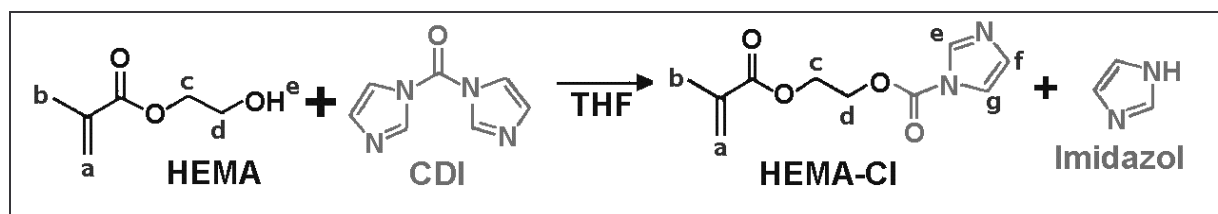


Abb. 14: Synthese von aktiviertem Hydroxyethylmethacrylimidazolylcarbammat (HEMA-CI) nach [12]

Das erhaltene leicht visköse Produkt löste man in 400 ml Ethylacetat (>99 %) und schüttelte es anschließend mit der gleichen Menge an deionisiertem Wasser aus. Dieser Prozess wurde dreimal wiederholt und im Anschluss erfolgte ein dreimaliges Gegenschütteln der erhaltenen Wasserphase mit Ethylacetat. Alle Ethylacetatphasen wurden vereinigt und getrocknet über wasserfreiem MgSO_4 (wasserfrei). Die erhaltene wasserfreie Ethylacetat-Mischung wurde filtriert und erneut mit einer Spatelspitze Hydrochinonmonomethylether versetzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel bei 35°C im Rotavapor unter Vakuum abrotiert. Das Produkt der ersten Synthese wurde unmittelbar nach der Entnahme einer Probe für Analysezwecke in einem zweiten Reaktionsschritt weiterverarbeitet (siehe Abb. 15).

Dazu löste man für einen kleinen Ansatz 10 g HES in 90 ml wasserfreiem Dimethylsulfoxid (DMSO, < 0,01 % Wasser, Merck) in einem ausgeheizten und verschlossenen 250 ml Rundkolben unter Stickstoffatmosphäre mittels intervallartigem Erwärmen mit einem Fön und unter Rühren. Nach dem Lösen von 2,0 g bzw. 20 g 4-(N,N-Dimethylamino)pyridin (DMAP, 99 %, Merck) erfolgte die Zugabe einer vorher kalkulierten Menge HEMA-CI aus der ersten Synthesestufe (siehe Abschnitt 3.2.4.1). Die Mischung rührte maximal 6 Tage bei Raumtemperatur. Nach dem dritten Tag erfolgte in regelmäßigen Abständen ein Probenzug für die DC- Analyse der Reaktionsprodukte.

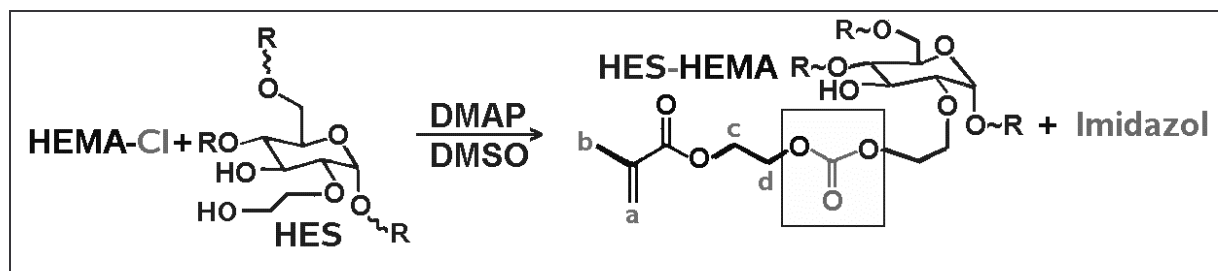


Abb. 15: Synthese von HES-HEMA [12]

Dabei konnte das Fortschreiten der Umsetzung über eine tägliche DC-Kontrolle und der Abnahme der HEMA-Cl Menge in der Mischung beobachtet werden. Die Reaktion von HEMA-Cl mit HES wurde abgebrochen, als keine Veränderung der HEMA-Cl Menge mehr nachweisbar war. Für den Abbruch der Reaktion erfolgte entsprechend der Reaktionsmengen die Zugabe von entweder 2 ml für den kleinen Ansatz bzw. 20 ml konzentrierter Salzsäure für den großen Ansatz. Dabei dient die Säure zum neutralisieren des DMAP und des Imidazols in der Reaktionsmischung. Die Reaktionsmischung überführte man anschließend zügig in Dialyseschläuche (Roth). Sie lagerten dann über den Zeitbereich einer Woche in destilliertem Wassers bei 4 °C im Kühlschrank, wobei das Wasser täglich gewechselt wurde um unerwünschte Reaktionsprodukte abzutrennen. Das erhaltene Dialysat wurde gefriergetrocknet und das so entstandene weißlich, faserig schimmernde Produkt wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei –20°C im Gefrierschrank gelagert.

Die Synthese von HES-HEMA wurde in einem weiteren Versuchsansatz mit einer 10fach größeren Ansatzmenge durchgeführt.

3.2.4.3 Analytik der Synthesestufen und des Endprodukts

Zur Analyse der verschiedenen Synthesestufen wurden unterschiedliche Methoden, wie die Dünnschichtchromatographie (DC), Infrarotspektroskopie (IR), Kernresonanzspektroskopie (NMR), sowie die Gelpermeationschromatografie (GPC) angewendet.

Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie erfolgte die Untersuchung des Reaktionsverlaufs beim Umsatz von HEMA-Cl mit Hydroxyethylstärke. Für die Untersuchung versetzte man eine Reaktionsprobe von 0,2 ml mit 1 ml Chloroform. Chloroform wurde verwendet, da sich die meisten Stoffe dieser Synthese sehr schlecht in Chloroform lösen, ausgenommen HEMA-Cl. Die Mischung wurde mit einer 1 µl Kapillaren auf eine Kieselgelplatte aufgetragen. Des Weiteren wurde reines HEMA als Vergleichsprobe aufgetragen. Als Fließmittel wurde Ethylacetat verwendet. Nach dem Trocknen wurde die Platte mit Kaliumpermanganatlösung unter einem Abzug besprüht und die sich zeigenden Flecken markiert. Für die Auswertung der DC-Analyse verglich man die erhaltenen Flecken auf der Platte.

Die Kernresonanzspektroskopie wurde eingesetzt zur Bestimmung der Reinheit der hergestellten Zwischenstufe und zur Kontrolle der HEMA-Cl- und der HES-HEMA-Bildung. Dabei erfolgte die Erstellung der ^1H -NMR sowie der ^{13}C -NMR der Proben.

Stoff	^1H -NMR/ CDCl_3			^{13}C -NMR / CDCl_3	
Ethylacetat	CH_3CO	s	2,05	CO	171,36
	CH_2CH_3	q, 7	4,12	CH_2	60,49
	CH_2CH_3	t, 7	1,26	CH_3	14,19
				CH_3CO	21,04
THF	CH_2	m	1,85	CH_2	25,62
	CH_2O	m	3,76	CH_2O	67,97
HQME	CH	d	6,56	CH	117
	OH	s	5,00	COH	149,9
	OCH_3	s		COCH_3	

Tab. 13: NMR- Signale von verwendeten Syntheselösungsmitteln [72]

Die jeweiligen NMR-Proben wurden in deuteriertem Lösungsmittel aufgenommen. Dabei löste man die Ausgangsstoffe HEMA und die Zwischenstufe HEMA-Cl in deuteriertem Chloroform, während das gereinigte Endprodukt der Synthese in deuteriertem Wasser (D_2O) gelöst wurde. Die jeweiligen Proben, etwa 20 mg bzw. 0,2 ml Substanz, nahm man in 0,7 ml Lösungsmittel auf und ließ sie anschließend vermessen.

Stoff	Protonenanzahl	ppm	Gesamthöhe / Höhe [cm] für ein Proton	Verhältnis
Ethylacetat	3	1,84	13,2 cm / 4,4 cm	1
HEMA-Cl	1	1,93	8,6 cm	2
Stoff	Protonenanzahl	ppm	Gesamthöhe / Höhe [cm] für ein Proton	Verhältnis
Ethylacetat	3	3,90	10 cm / 3,3 cm	1
HEMA-Cl	2	4,33	10,4 cm / 5,2 cm	1,6
HEMA-Cl	2	4,47	10,5 cm / 5,2 cm	

Tab. 14: Vergleich von benachbarten Flächenintegralen der Protonen von Ethylacetat zu HEMA-Cl [72]

Für die Auswertung der ermittelten NMR-Daten erfolgte eine Abgleich mit NMR-Daten für die während Synthese und der Aufreinigung verwendeten Lösungsmittel (siehe Tab. 13). Dabei dienten die Lösungsmittelpeaks auch zur Berechnung des HEMA-Cl Anteils aus der ersten Reaktionsstufe zur Herstellung von HES-HEMA. Für die Berechnung wurde das gemessene ^1H -NMR analysiert auf Verunreinigungen in der Probe, dabei zeigten die meisten Proben Reste des Lösungsmittels Ethylacetat. Es wurde aus den angegebenen und ausgemessenen Integralen definierter NMR-Peaks das Verhältnis von Lösungsmittelresten zum

Reaktionsprodukt HEMA-Cl bestimmt (siehe Tab. 14) und damit die real eingesetzte Menge an HEMA-Cl ermittelt.

Aus den betrachteten Integralen ergibt sich ein errechnetes mittleres Verhältnis Ethylacetat : HEMA-Cl von 1:1,8 also enthält die Probe 64,3 % HEMA-Cl. Für die Umsetzung von HEMA-Cl mit HES im kleinen Ansatz wurden direkt 3,12 g eingesetzt. Bei einem prozentualen Anteil von 64,3 % an HEMA-Cl in der verwendeten Probe entspricht dies einer Menge von 2,01 g an reinem reaktivem Zwischenprodukt für die weitere Reaktion. Durch die geringere Menge an eingesetztem HEMA-Cl verändert sich im Weiteren auch der mögliche Substitutionsgrad der Synthese.

Es wurde für die Analytik des Reaktionsprodukts Infrarotspektren (FTIR) aufgenommen. Dazu wurde getrocknete Substanz mit Kaliumbromid für Infrarotspektroskopie verrieben und unter Vakuum zu einem Preßling geformt. Nach einem Luftabgleich erfolgte die Vermessung des Preßlings über einen Bereich von 4000 bis 450 cm^{-1} . Die Probenmenge betrug ca. 1,5 mg Substanz auf 120 mg KBr. Verwendet wurde das FT-IR-Equinox IFS 55 der Firma Bruker. Die Auswertung der IR-Spektren erfolgt mit der OPUS-Spektroskopiesoftware Version 4.

Für die Analyse der Molekulargewichtsverteilung der Hydroxyethylstärke vor und nach der chemischen Derivatisierung erfolgten Untersuchungen mit Hilfe der Gelpermeationschromatographie (GPC) [56]. Für die GPC-Messungen verwendete man das Lösungsmittel DMF (entgast und membranfiltriert mit 0,1M LiBr), wobei sich die Hydroxyethylstärke erst durch leichtes Erwärmen oder massives Schütteln darin löste. Die Auftrennung der Probe erfolgte mittels PL-Mixed C Säule von ca. 500 g/mol bis 2 Mio g/mol. Detektiert wurde die aufgetrennte Probe mit einem Melz LCD201 Differential Refraktometer bei 35 °C und einem Tristar 3- Winkel- Lichtstreuendetektor (Wyatt MiniDwan) bei Winkeln von 30°, 90° und 120°. Die Auswertung erfolgte mit ASTRA und Corona 1.40 Software

3.2.5 Herstellung und Charakterisierung von neu entwickelten Hydrogelmikropartikeln auf Basis von HES-HEMA

Für die Herstellung von Hydrogelmikropartikeln wurde ein neues Verfahren auf der Basis einer Photopolymerisation entwickelt. Dieses Verfahren und die Analytik zur Charakterisierung der erhaltenen Ergebnisse sind in diesem Abschnitt dargestellt.

3.2.5.1 Photopolymerisation der neu entwickelten Hydroxyethylstärke-hydroxyethylmethacrylatderivates zu Mikropartikeln

Die Entwicklung eines Herstellungsverfahrens von Hydrogelmikropartikel auf der Basis von mit Hydroxethylmethacrylat derivatisierter Hydroxyethylstärke erfolgte in rein wässriger Lösung unter Verwendung eines Photopolymerisationsverfahrens.

Für sämtliche Polymerisationsexperimente wurde HES-HEMA aus dem Synthesegroßansatz verwendet. Als Reaktionsgefäß für die Polymerisation bei 365 nm wurden Quarglasküvetten (QS) der Firma Hellma in den Sondergrößen 10 und 20 ml verwendet.

Für den ersten Polymerisationsansatz wurden 20 g Probenmischung hergestellt in dem 10 g 26 % PEG-Stammlösung mit 10 g 15 % HES-HEMA-Stammlösung gemischt wurden. Die Stammlösungen wurden unter Verwendung eines isotonischen Natriumphosphatpuffers hergestellt. Die Mischung wurde in einer Küvette in den Strahlengang einer Quecksilberdampfampe eingebracht und mit einem Magnetrührer (IKA Combimag, Janke & Kunkel) mit 300 Upm bei Raumtemperatur konstant gerührt. Anschließend setzte man 2 ml einer Mischung aus Irgacure 2959 0,01 g/ml in isotonischen Natriumphosphatpuffer hinzu und ließ die Mischung für 10 min reagieren. Polymerisiert wurde bei einer Lichtintensität von 20 mWcm^{-2} .

Für die nächsten Polymerisationsexperimente wurde dann die Probenansatzmenge von 20 g auf 15 g und parallel dazu auf 10 g reduziert. Untersucht wurden dann 15 g Ansätze mit 8 % PEG 12.000 und 2,0 % HES-HEMA, 7,3 % PEG 12.000 und 2,5 % HES-HEMA, sowie 8,5 % PEG 12.000 und 1,5 % HES-HEMA. Diese Ansätze wurden auf 10 g Ansätze umgerechnet. Die Proben wurden 5 min gemischt mit dem Vortex Genie 2 (Roth, D-Karlsruhe) und anschließend in den Strahlengang gebracht und bei 700 UpM durch eine Magnetrührer weitergemischt während der Polymerisation.

Im Anschluss an diese Untersuchungen wurden die Polymerisationsmischungen hergestellt auf der Basis von 4 % HES-HEMA-Stammlösung, 26 % PEG-Stammlösung und der entsprechenden Pufferlösung in variierenden Mischungsverhältnissen (siehe Tab. 15). Als Puffer verwendete man einen isotonischen Natriumphosphatpuffer pH 7,0 oder einen Natriumacetatpuffer pH 5,0. Die Ansatzgröße betrug 10,0 g. Den Photoinitiator setzte man ab diesen Versuchen in einer Konzentration von 0,05 % ein.

Die Mischungen aus HES und PEG entsprechend der Tabelle 15 überführte man anschließend in eine Quarzglasküvette und brachte sie so in den Strahlengang einer Quecksilberdampfampe, dass die Probe ebenfalls mit einer Lichtintensität von 20 mWcm^{-2} bestrahlt wurde. Während der Photopolymerisation wurden die Probenansätze teilweise durch einen Magnetrührer konstant gerührt oder in Ruhe polymerisiert.

Proben-Nr.	HES-HEMA 4 % [g]	Wasser, Puffer oder Proteinlsg. [g]	Lysozym in [mg/ml]	PEG 26 % [g]	Irgacure 2959-Lsg. 1 % [g]	Mischung
1	9,4	0,9		4,2	0,5	Gerührt
2	7,5	2,4		4,6	0,5	Gerührt
3	3,7	2,5		3,3	0,5	Gerührt
4	2,5	3,0		4,0	0,5	ungerührt
5	2,5	2,5		4,5	0,5	ungerührt
10	2,5	2,0	gesättigt	5,0	0,5	ungerührt
11	2,5	2,0	22,3	5,0	0,5	ungerührt
12	2,5	2,0	19,8	5,0	0,5	ungerührt
6	2,5	2,0		5,0	0,5	ungerührt
7	3,0	1,5		5,0	0,5	ungerührt
13	3,0	1,5	gesättigt	5,0	0,5	ungerührt
8	3,3	1,2		5,0	0,5	ungerührt
9	4,5	0		5,0	0,5	ungerührt

Tab. 15: Untersuchte Mischungen für die Herstellung von Mikropartikeln

Zur Ermittlung der optimalen Methode für die Herstellung von Mikropartikeln mittels Photopolymerisation wurden verschiedene Rezepturen getestet, d.h. die Mischungsverhältnisse von HES-HEMA und PEG wurden variiert wie aus der Tabelle 15 ersichtlich. Daneben untersuchte man den Einfluss verschiedener Rührgeschwindigkeiten im Bereich von 100-700 U/min auf das Polymerisationsergebnis. Gerührt wurde das System mit in die Lösung eingebrachten Magnetrührfischen, welche durch den Magnetrührer IKA Combimag angetrieben wurden. Um den Einfluss der Temperatur auf die Mikropartikelbildung zu untersuchen, stellte man in weiteren Versuchsansätzen die verwendeten Polymerlösungen auf verschiedene Temperaturen (20°C, 15°C, 8°C und 4°C) ein. Des Weiteren wurde untersucht, inwieweit das Polymerisationsergebnis durch vorheriges Mischen und Separieren lassen beeinflusst wird.

Nach erfolgter Polymerisation überführte man die entstandene Suspension komplett in ein Zentrifugenröhrchen und zentrifugierte bei 5.000 U/min für 10 min die Mischung in der Zentrifuge Allegra 64 R (Beckmann Coulter, D-Krefeld0). Der Überstand wurde abgetrennt, der Rückstand mit bidestillierten Wasser aufgeschüttelt und gewaschen und erneut zentrifugiert bei 5.000 U/min für 10 min. Dieser Vorgang wurde insgesamt fünfmal durchgeführt, um das für den Polymerisationsprozess benötigte Polyethylenglykol aus der polymerisierten Probenmischung zu entfernen. Zum Schluss wurde der Probenbodensatz ein

weiteres Mal mit Wasser redispergiert, im Tiefkühlschrank eingefroren und lyophilisiert mit dem Gefriertrockner Alpha 2-4 (Firma M. Christ). Die getrockneten Proben wurden ausgewogen und anschließend bei -18°C gelagert.

3.2.5.2 Mikroskopische und Elektronenmikroskopische Untersuchung der Mikropartikel

Für die Analyse der verschiedenen Verfahrensweisen zur Herstellung der Mikropartikel untersuchte man alle Proben nach der Polymerisation unter dem Lichtmikroskop und dokumentierte das Ergebnis mittels Digitalfotografie. Dazu verwendete man anfänglich ungereinigte Proben direkt im Anschluss an die durchgeführte Polymerisation. Später wurden Proben nach dem Aufreinigungsprozess aus der vorbereiteten Mischung für die Gefriertrocknung entnommen und bei einer 100fachen Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop analysiert.

Es wurden neben den Lichtmikroskopischen Aufnahmen von ausgewählten Proben auch rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (REM) gemacht. Die Aufnahmen erfolgten an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen im Bereich pharmazeutische Technologie mit einem Rasterelektronenmikroskop DSM 940A (Zeiss, D-Jena) mit integrierter Frame Grabber Karte und dem Programm Orion Vers. 5.25. Für die Probenpräparation wurden kleine Mengen an pulveriger Substanz mit einem Spatel entnommen und aus ca. 1 cm Höhe auf Tempfix (befestigt mit doppelseitigem Klebeband auf Alufolie) fallengelassen. Die Präparate werden bei ca. 50°C fixiert und überschüssiges Material wurde weggeblasen mit einer Ohrenspritze. Die Proben der Mikropartikel wurden gesputtert mit dem Sputtercoater Biorad E 5100 bei ca. 0,04 mbar, einer Beschleunigungsspannung von 2,1 kV und einer Sputterzeit von 4 mal 60 s. Anschließend wurden die gesputterten Proben unter dem REM analysiert.

Die transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen (TEM) erfolgten am LEO 922 (Leo, D-Oberkochen) 120 kV an der Universität Braunschweig. Für die TEM-Aufnahmen wurden Proben der Mikropartikel im wässrigen Medium suspendiert und über 2 Wochen gelagert. Zur Präparation der zu untersuchenden Systeme wurden Proben zwischen zwei Goldträgern in schmelzendem Stickstoff bei -210°C eingefroren. Diese Proben wurden in einer Gefrierbruchätzanlage BAF 400 (Balzers, D-Wiesbaden) gebrochen bei -100°C und einem Druck von $5 \cdot 10^{-6}$ bar. Die Bruchflächen wurden zuerst mit einer Platin-Kohle-Schicht (2 nm) beschattet unter einem Winkel von 45° und danach mit einer reinen Kohleschicht (20 nm) unter einem Winkel von 90° . Die so erhaltenen Replika wurden dann mit konzentrierter Schwefelsäure und Wasser gereinigt. Diese Replika analysierte man dann im Elektronenmikroskop.

3.2.5.3 Partikelgrößenbestimmung der Hydrogelmikropartikel

3.2.5.3.1 Laserdiffraktometrie

Zur weiteren Charakterisierung der hergestellten Mikropartikel analysierte man die Partikelgrößen der verschiedenen Versuchsansätze. Bei der Partikelgrößenbestimmung mit Hilfe des LS Particle Size Analyzer 230 (Beckmann Coulter, D-Krefeld) erfolgte die Messung der Partikelgrößen über die Kombination von Laserdiffraktometrie mit der Polarisation Intensity Differential Scattering (PIDS)-Technologie. Die verwendete PIDS-Technologie beruht auf der Streuung von polarisiertem Licht [73] und ergänzt den Messbereich der Laserdiffraktometrie um den Submikronbereich. Die Partikel wurden anfänglich in trockener Form in die mit demineralisiertem Wasser gefüllte Messzelle gegeben bis vom Messgerät angezeigt wurde, dass eine ausreichende Befüllung für die Messung erreicht worden war. Gemessen wurden diese Proben bei einer Pumpengeschwindigkeit von 75 %. Bei der späteren Partikelgrößenmessung von vorsuspendierten Mikropartikeln setzte man die Pumpengeschwindigkeit auf 35 % herab. Die Mikropartikel wurden mit variierenden Konzentrationen an Natriumdodecylsulfat (SDS) in bidestilliertem Wasser suspendiert (siehe Abschnitt 4.3.2). Dazu wurden die Probenansätze von 1mg in 1 ml oder 2 ml 10 prozentiger SDS-Lösung mit Hilfe des Vortex Genie 2 (Roth, D-Karlsruhe) oder im Ultraschallbad (Bandelin, Sonotex) für 30 s dispergiert. Weitere Mikropartikelproben wurden in reinem bidestilliertem Wasser dispergiert und vermessen.

3.2.5.3.1 Mikroskopische Bestimmung der Partikelgrößenverteilung

Eine weitere verwendete Methode zur Bestimmung der Partikelgrößenverteilung basierte auf der Analyse von mikroskopischen Bildern der hergestellten Proben. Dazu wurde jeweils eine Spatelspitze gefriergetrockneter Probe in Wasser verteilt und anschließend auf einen Objektträger aufgebracht. Die Probe fotografierte man mit einer Digitalkamera in einem Zeitbereich von 5-10 min im Lichtmikroskop bei 100facher Vergrößerung fünfmal in unterschiedlichen Bildausschnitten. Die digitalen Bilder wurden anschließend mit einem Filter und dem Programm analySIS 3.1 der Firma Soft Imaging Software GmbH in Münster bearbeitet. Der Filter sorgt dafür, dass die Grenze zwischen den Partikeln und dem umgebenen Medium durch eine schwarze Umrandung voneinander getrennt wird. Diese so vorbereiteten Bilder wurden anschließend mit einer Software von Wengst [74] bearbeitet. Dabei bestimmt das Programm die Flächen jedes einzeln umrandeten Bereichs und gleichzeitig ermittelt es die Durchmesser der umrandeten Flächen. Bei runden Partikeln beträgt das Verhältnis des Durchmessers der ermittelten Fläche zum Durchmesser eines entsprechenden Kreises ungefähr 1. Für die Partikelgrößenanalyse wurden alle Flächen berücksichtigt, bei denen das Verhältnis der zwei Durchmesser zueinander mehr als 0,82 betrug. Die Proben wurden für Quellungsuntersuchungen in Wasser suspendiert bei 4°C

gelagert und nach 2h, 1 Tag, 1 Woche und 2 Wochen nach dem gleichen Verfahren untersucht.

3.2.5.4 Zytotoxizitätstest der Polymersiationsmischungen und des Polymerisationsproduktes

Für die Untersuchung zytotoxischer Effekte durch die eingesetzten oder entwickelten Stoffe für die Herstellung von Hydroxyethylstärkepartikeln verwendete man einen Neutralrottest. Bei der Substanz Neutralrot (siehe Abb. 16) handelt es sich um einen kationischen Farbstoff, welcher über Diffusion in die Zelle aufgenommen wird [75]. Der Farbstoff wird an die lysosomale Matrix der Zelle gebunden und akkumuliert dadurch in der Zelle. Wird eine Zelle durch die zugesetzte Testsubstanz geschädigt, ist die Zelle nicht mehr in der Lage den Farbstoff zurückzuhalten. Beim Auswaschen wird der Farbstoff entfernt und ermöglicht die Unterscheidung von lebenden und geschädigten Zellen.

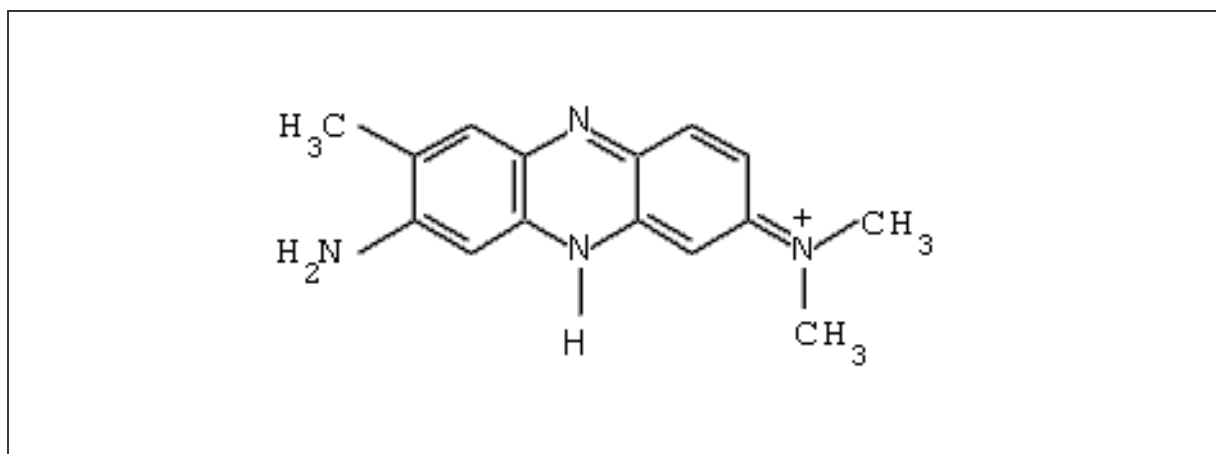


Abb. 16: Neutralrot

Für die Untersuchungen wurden folgende Probenmedien analysiert: PEG 12.000 Stammlösung (24 %), polymerisierte HES-HEMA-Mikropartikel (4 %), unpolymerisierte HES-HEMA (4 %), sowie der Photopolymerisator Irgacure (0,05 %) und eine Mischung aus PEG 12.000 (24 %), Irgacure (0,05 %) und HES- HEMA (4 %).

Der Zytotoxizitätstest wurde mit konfluent kultivierten humane Fibroblasten (HDF-Zellen) der Passage 8-15 (Organesis, USA-Camden, MA) durchgeführt. Dazu entnahm man 0,10 ml aus einer Zellsuspension, welche nach Trypsinisierung entstanden war. Diese 0,10 ml Zellsuspension entsprachen dabei ca. 2×10^5 Zellen und man säte diese anschließend in 24er-Well-Platten ein. Diese 24er- Wells wurden 72 h bei 37°C und wasserdampfgesättigter, 5 % CO₂-haltiger Atmosphäre in einem Brutschrank (Integra-Bioscience, D-Fernwald) inkubiert. Als Kulturmedium für die HDF-8 Zellen verwendete man ein Ready- Mix komplettiertes DMEM-Kulturmedium (Sigma, D-Deisenhofen). Auf die nach der Inkubation erhaltenen Fibroblasten- Layern brachte man pro Well 0,5 ml Probenmedium bzw. Blindprobe auf und inkubierte diese Lösungen für 10 min unter UV-Licht. Nach der erfolgten UV- Bestrahlung wurde das Testmedium abgesaugt und mit 0,5 ml PBS (ICN, D-Eschwege)

gewaschen. Die Proben gab man für 24 h zum Ausgleichen in den Brutschrank bei 37°C und wasserdampfgesättigter, 5 % CO₂-haltiger Atmosphäre. Anschließend versetzte man die Proben mit 0,5 ml Neutralrotlösung. Diese Proben bebrütete man dann 3 h unter den gleichen Bedingungen. Nach Beendigung des Bebrütungsvorganges saugte man die Farbstofflösung ab und wusch dreimalig mit PBS. Im nachfolgenden Schritt erfolgte die Extraktion des inkorporierten Neutralrots durch die Zugabe der Extraktionsmischung von 50 % Ethanol mit 1 % Essigsäure und 15 min Schütteln sowie heftiges Auf- und Abpipettieren. Die Farbstofflösung wurde anschließend durch 4 min zentrifugieren bei 5000 UpM (Umdrehung pro Minute) von den Zellfragmenten befreit und bei 540 nm gegen das Extraktionsmittel vermessen. Die ermittelten Blindwerte stellten die Werte dar, welche als 100 % lebende Zellen angenommen wurden.

3.2.6 Freisetzungsuntersuchungen an proteinbeladenen Hydrogel-mikropartikeln

Die in dieser Arbeit entwickelten Hydroxyethylstärkepartikel sollten eingesetzt werden als Freisetzungssystem für Proteine. Aus diesem Grund wurden die Freisetzungseigenschaften von lysozymbeladenen Mikropartikeln mit den in diesem Abschnitt beschriebenen Methoden untersucht.

3.2.6.1 Untersuchung der Membrandurchlässigkeit von Dialysemembranen für die Anwendung in Freisetzungsuntersuchungen

Für die Untersuchungen zur Bestimmung der Membrandurchlässigkeit für Lysozym wurden Dialysiermembranen mit einer mittleren Ausschlußgrenze von Mw 100.000 Dalton und 300.000 Dalton getestet, sowie Milliporemembranen mit 0,2 µm Porendurchmesser.

Die Bestimmung der Lysozymkonzentration erfolgte mit Hilfe des unspezifischen Bradford-Nachweis (siehe Abschnitt 3.2.3.1).

Als Apparatur für die Bestimmung der Membrandurchlässigkeit wurden modifizierte Franzzellen, wie in Abbildung 17 verwendet. Als Donator- und Akzeptormedium setzte man einen 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,00 konserviert mit 0,02 % Natriumazid ein. Die Lysozymmenge im Donatorvolumen von 1 ml betrug mindestens 0,3 mg / ml. Für die Untersuchung stanzte man aus dem Dialyseschläuchen oder Milliporefiltern Membranen in der entsprechenden Größe aus und wässerte sie über drei Tage im täglich gewechselten Puffermedium. Die mit Donator und Akzeptormedium versehenden Franzzellen wurden in einem temperierten Wasserbad bei 37°C ± 1°C inkubiert. Das Probenvolumen entnahm man mit einer Hamiltonspritze 100 µl und ersetzte es durch temperierte Pufferlösung. In definierten Zeitabständen zog man Proben, fror sie ein und analysierte sie später quantitativ (siehe Abschnitt 3.2.3.1).

3.2.6.2 Freisetzungsuntersuchung an Lysozym beladenen Mikropartikeln

Zur Untersuchung der aus dem Mikropartikel abgegebenen Proteinmenge wurden modifizierte Franzzellen verwendet mit einem Donatorvolumen von 2 ml und einen Akzeptorvolumen von ca 6,3 ml \pm 0,5 ml (siehe Abb.17). Man verwendete zwischen Donator und Akzeptorbereich als Barriere entweder eine Dialysemembran 300.000 Dalton oder einer Milliporemembran 0,2 μ m. Als Medium setzte man einen Phosphatpuffer pH 7,00 konserviert mit 0,02 % Natriumazid ein und temperierte die Franzzellen mit Hilfe eines Wasserbades auf 37 °C.

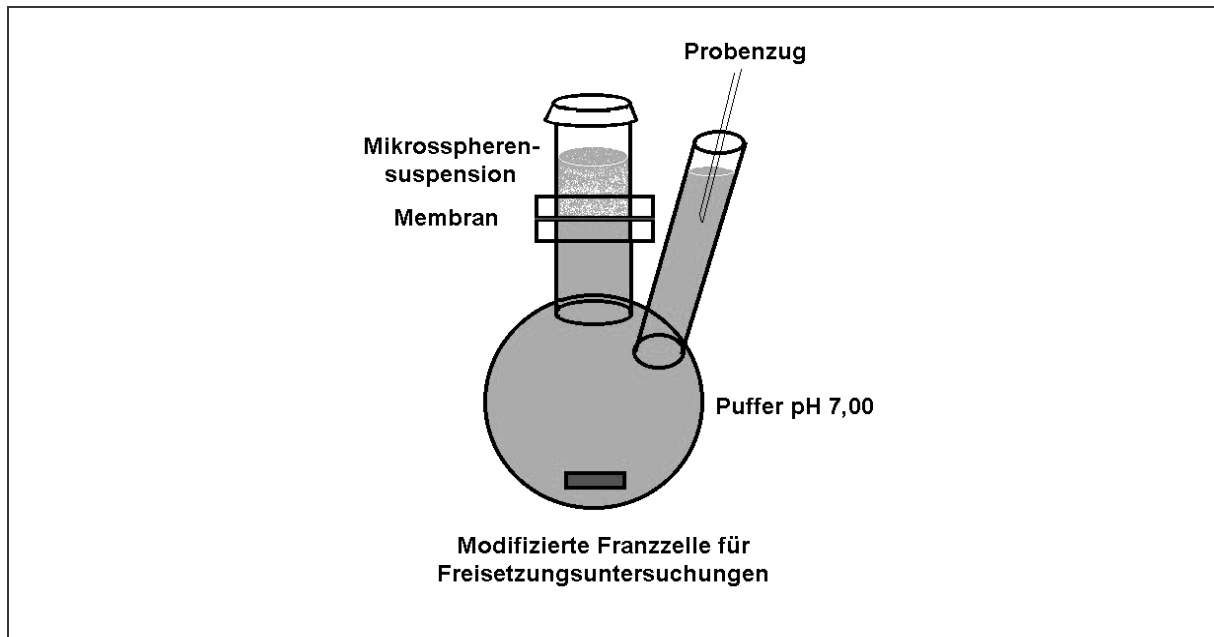


Abb. 17: Modifizierte Franzzelle

Der Probenzug erfolgte mit einer Hamiltonspritze 0,5 ml. Das entnommene Volumen wurde direkt im Anschluss ergänzt. Alle Proben wurden bei -18°C eingefroren und für die Proteinbestimmung aufgetaut. Die Analyse der freigesetzten Proteinmenge erfolgte mit Hilfe von Methoden, welche in Abschnitt 3.2.6.3 beschrieben sind.

3.2.6.3 Lysozymanalytik für die Freisetzungsuntersuchungen

3.2.6.3.1 Lysozymnachweis mit Elektrophorese und Coomassieblaufärbung

Es wurde für die Analytik der freigesetzten Lysozymmengen als erstes ein Verfahren auf Basis einer Elektrophorese entwickelt. Dabei diente die Elektrophorese dem Aufkonzentrieren der Proteinproben, dem selektiveren Nachweis des Lysozyms und der Senkung der Nachweisgrenze.

Als Substanzen wurden Acrylamid-/Bisacrylamid 30/0,8 (30g AA + 0,8 Bis/ 100 ml), ein Lower Tris (1,5 M Tris/ 0,4 % SDS/ pH 8,80 bzw. 91 g Tris-Base + 20 ml 10 % SDS in 500ml) und ein Upper Tris (0,5 M Tris/ 0,4 % SDS/ pH 6,7 bzw. 30,5 g Tris-Base + 20 ml 10 % SDS in 500 ml) eingesetzt. Als Laufpuffer verwendete man einen 8fach Puffer (1,85 M Tris/ 0,67 M

Glycin/ 0,81 %SDS/ 16 mM EDTA/ pH 8,80 bzw. 560 g Tris-Base+ 120 g Glycin+ 200 ml 10 % SDS+ 80 ml 0,5 M EDTA in 2500 ml), sowie 40 % APS und 40 % TEMED.

Unter- / Trenngel 15 % T			Ober- / Sammelgel	
Substanzen	1 Gel / Menge	2 Gele / Menge	1 Gel / Menge	Substanzen
AA-Bis	10 ml	5 ml	1,4 ml	AA-Bis
Lower-Tris	5 ml	2,5 ml	2,0 ml	Lower-Tris
Wasser	4,8 ml	2,4 ml	4,2 ml	Wasser
Temed	16 µl	8 µl	10 µl	Temed
APS	24 µl	12 µl	16 µl	APS
Unter/ Trenngel 12,5 % T			Ober-/ Sammelgel	
AA-Bis	4,1 ml		1,4 ml	AA-Bis
Lower Tris	2,5 ml		2,0 ml	Lower Tris
Wasser	3,2 ml		4,2 ml	Wasser
TEMED	8 µl		10 µl	TEMED
APS	12 µl		16 µl	APS

Tab.16: Substanzen und deren verwendete Mischungsverhältnisse für die Herstellung von Elektrophoresegelen

Die Gellösung wurde bis 5 mm unter die Taschen des Kamms eingefüllt und mit ca. 500 µl Wasser überschichtet (siehe Tab. 16). Vor dem Gießen des Obergels spülte man die Geloberfläche mit etwas Obergellösung. Das fertige Gel bereitete man für den Probeneintrag vor und anschließend beschickte man es mit den aufgearbeiteten Proben. Dazu wurden 10 µl Probe mit 10 µl 4fach Probenpuffer verdünnt. Als Molekulargewichtsstandard wurde ein Niedermolekulargewichtsmarker (Sigmamarker, Low Range) verwendet der Proteine im Größenbereich von 6.500 bis 66.000 Dalton enthält. Der Gellauf erfolgte mit dem Mini Vertikal Gel System EC120 (EC apparatus Corporation, USA-Holbrook) mit Consort E 834 als Spannungsquelle bei 75 V im Sammelgel und anschließend bei 150 V im Trenngel.

Substanzen	Färbelösung	Entfärber I	Entfärber II
Coomassie Blau	200 mg		
Methanol	80 ml	80 ml	10 ml
Eisessig	20 ml	20 ml	14 ml
Wasser	auf 200 ml	auf 200 ml	auf 200 ml

Tab. 17: Elektrophoresefärbung

Nach abgeschlossener Elektrophorese färbte man die Proteinbanden der Gele mit Coomassie-Blau-Färbung. Die verwendeten Färbelösungen sind aufgeführt in Tabelle 17.

Dazu legte man die Gele für 1h in die Färbelösung. Anschließend wurden die behandelten Gele für ca. 30 min in den Entfärber I und anschließend für 1h in den Entfärber II gegeben. Unmittelbar danach wurden die Gele für die Lagerung in Folien eingeschweißt.

Mit Elektrophorese gekoppelten Lysozymnachweis erreichte man eine Nachweisgrenze von 5 µg/ml.

3.2.6.3.2 Lysozymanalytik mittels ELISA-Test

Um die Nachweisgrenze des Lysozyms weiter zu senken und einen noch selektiveren Nachweis durchzuführen wurde eine weitere Methode eingesetzt. Dabei handelt es sich um einen ELISA- Test mittels direktem Coating (siehe Abb. 18). Hierbei bindet man das Lysozym direkt an die Oberfläche einer ELISA- Platte (NUNC- Maxisorb) und lässt einen Antikörper darauf binden, welcher eine Farbreaktion auslöst (siehe Abb.18).

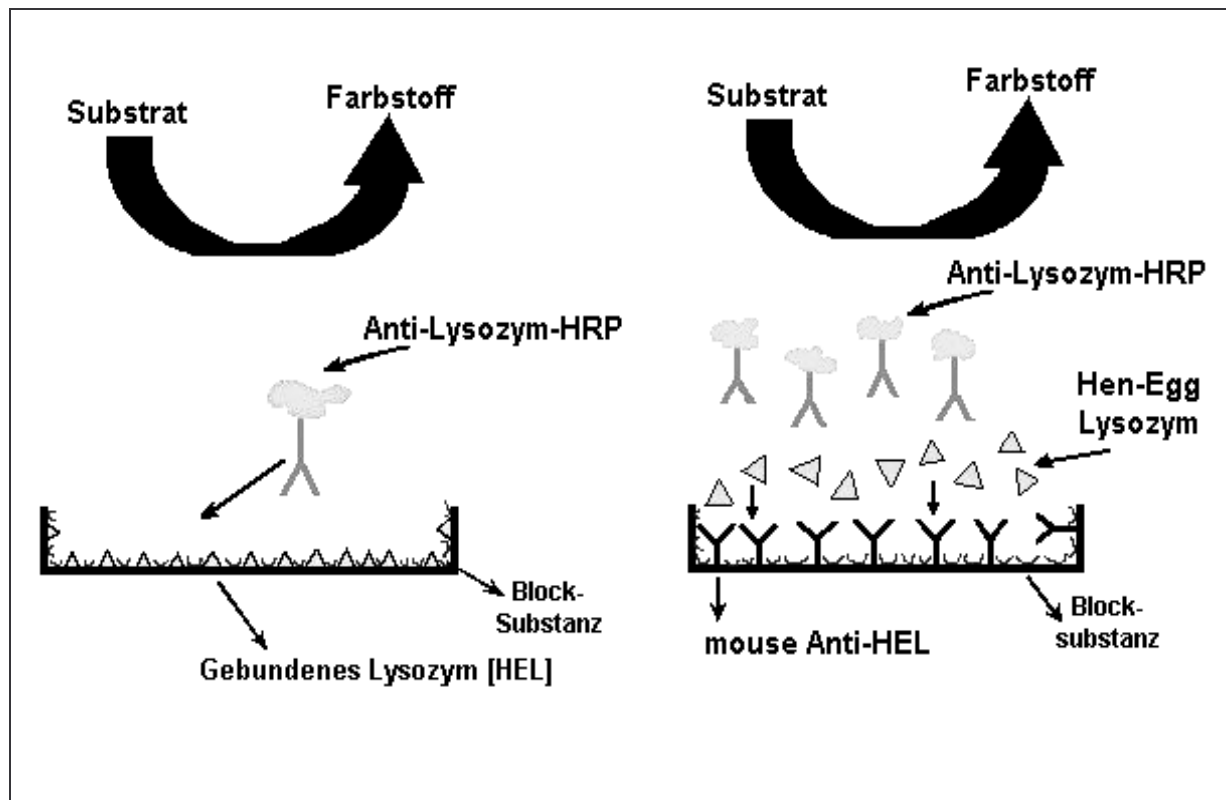


Abb. 18: ELISA- Test mit Direktcoating (A) und Sandwichmethode (B)

Für den ELISA-Test wurden folgende Lösungen hergestellt.

1. Magermilchpulver 2 % in PBS (einfach)
2. PBS-Puffer
3. 10 % H_2SO_4
4. Waschpuffer aus PBS (einfach) + 0,05 % Tween 20
5. Farbreagenz A und B (Lichtempfindlich)
6. Antikörper- HRP mit 2 % Magermilch- PBS 1:5000 verdünnt, das heißt 4 µl / 20 ml
7. Carbonatpuffer basisch

Die zu untersuchenden Lysozymproben verdünnte man 1:5 bzw. 1:2,5 mit dem Carbonatpuffer und pipettierte anschließend je 100 µl pro Vial auf NUNC- Maxisorb-Platten. Anschließend wurde die Platte über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Die Platten entleerte man, füllte 300µl pro Vial 2 % Magermilch- PBS auf die Platten und inkubierte das Ganze 2 h bei 37 °C in feuchter Kammer. Nach der Inkubation wurde die Platte entleert und dreimal mit Waschpuffer gereinigt. Danach stellte man eine Antikörperverdünnung von 1:5000 Anti- HEWL- HRP her und trug sie mit je 100 µl pro Vial auf die Platten auf und inkubierte wiederum 1 h in der feuchten Kammer bei 37 °C. Anschließend wurde die Platte wiederum entleert und dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Für das Farbreagenz mischte man 20 Teile der Lösung A mit 1 Teil der Lösung B.

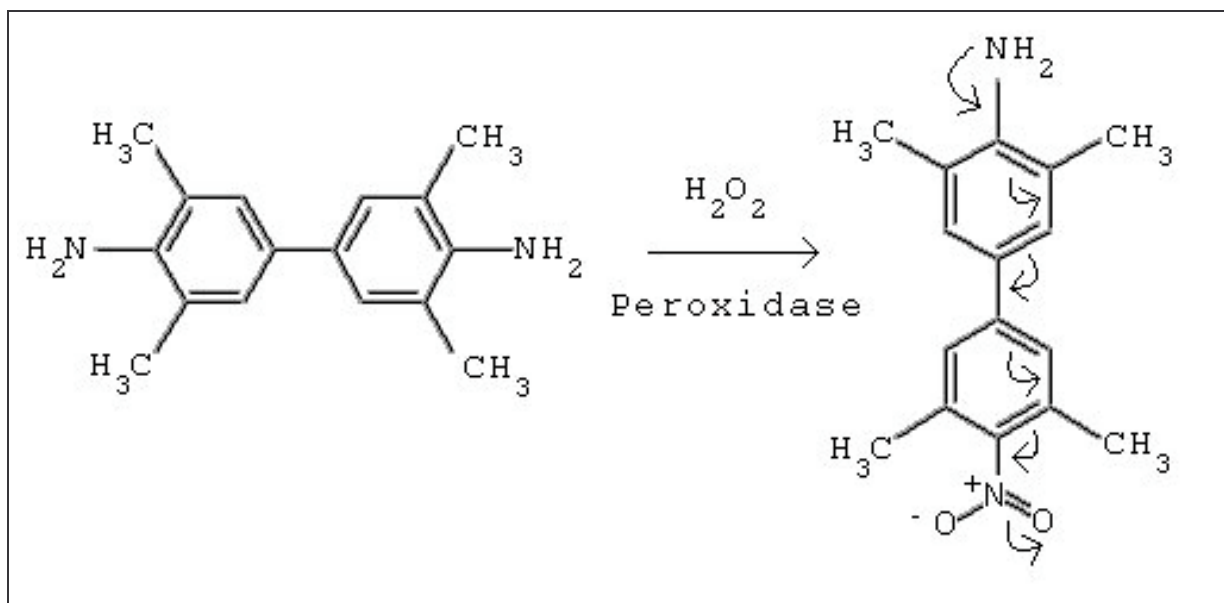


Abb. 19: Farbreaktion ELISA

Die Farbmischung gab man dann in die Vials mit 100 µl pro Vial und ließ sie an einem dunklen Ort bei RT 30 min reagieren (siehe Abb. 19). Die Reaktion der Horseradishperoxidase (HRP) mit dem Farbreagenz stoppte man mit 10 % Schwefelsäure je 100 µl pro Vial und vermaß die Probe innerhalb 1h bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Wässrige Zweiphasensysteme aus PEG und HES

Für die Entwicklung einer kontrolliert freisetzen Hydrogelformulierung aus Hydroxyethylstärke war es von entscheidender Bedeutung herauszufinden, ob die Stärke in Kombination mit einem weiteren Polymer in der Lage ist, wässrige Zweiphasensysteme auszubilden. Die Zweiphasenbildung sollte dann für die Herstellung von Hydrogelmikropartikeln genutzt werden. Aus diesem Grund richteten sich die ersten Experimente auf die Zweiphasensystembildung und deren Charakterisierung.

4.1.1 Zweiphasensysteme aus PEG und HES

Erste Untersuchungen zur Ausbildung von Zweiphasensystemen wurden durchgeführt an Mischungen aus Polyethylenglycol (PEG) und Hydroxyethylstärke (HES). Dazu untersuchte man zunächst wässrige Polymermischungen aus PEG 8.000 und HES 130.000, 200.000 oder 450.000. Diese Mischung wurde ausgewählt in Anlehnung an bekannte Zweiphasensysteme aus Dextran und PEG [1] sowie Hydroxypropylstärken (HPS) und PEG [53].

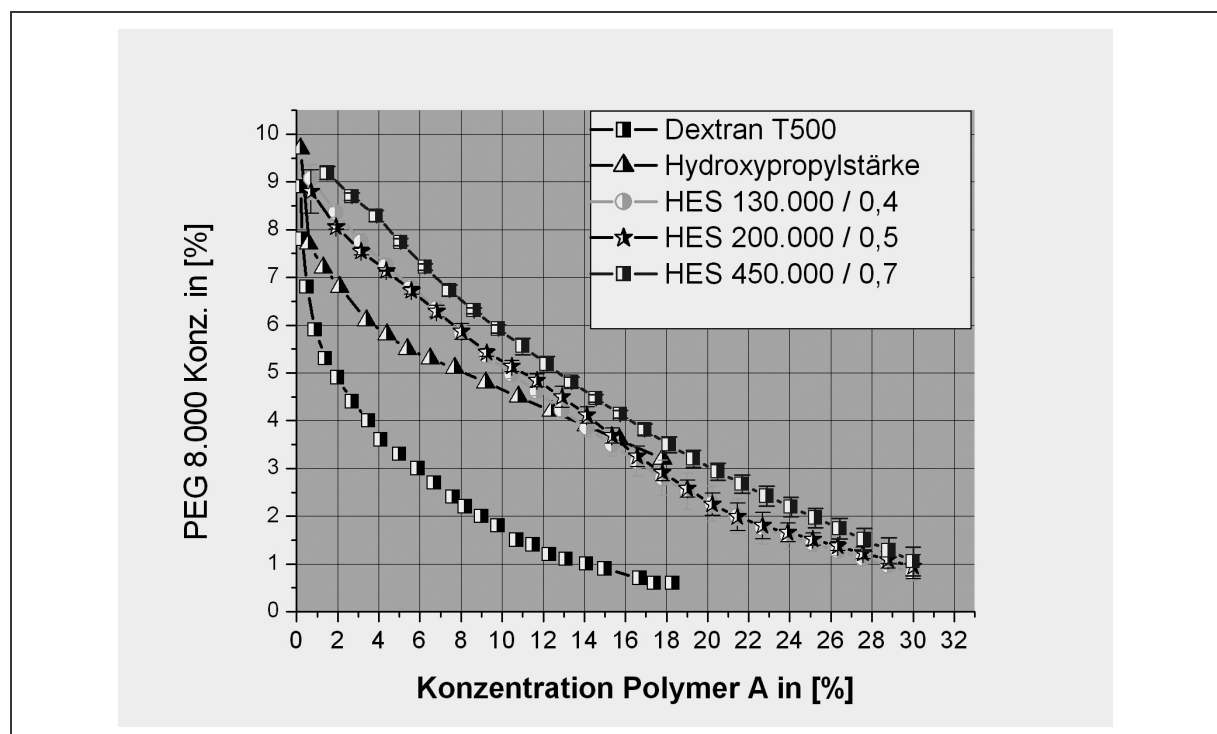


Abb. 20: Binodalkurvenverlauf verschiedener Zweiphasensysteme aus HES (M_w 130.000, 200.000, 450.000) und PEG 8.000 ($n=3$) im Vergleich zu bekannten Zweiphasensystemen (Dextran M_w 180.000 / PEG 8.000 [B] bzw. Hydroxypropylstärke 60.000-70.000 / PEG 8.000 [76])($n=3$)

Analog zu einem Verfahren von Albertsson [1] erfolgte die Analyse der Zweiphasenbildung über die Titration einer wässrigen Hydroxyethylstärkelösung mit einer wässrigen Polyethylenglykollösung. Kommt es zur Bildung eines wässrigen Zweiphasensystems, tritt eine bleibende Trübung in der Mischung der beiden Polymere auf. Die durchgeführten Experimente zur Bildung von wässrigen Zweiphasensystemen zeigen, dass auch Mischungen aus PEG und Hydroxyethylstärke in Wasser Phasenseparation zeigen. Abbildung 20 zeigt die ermittelten Binodalkurven, d.h. die Grenzen zwischen einphasigen Mischungen und zweiphasigen Systemen. Vergleicht man nun die Separationseigenschaften des neuen Zweiphasensystems mit bekannten Separationssystemen, wie dem aus Hydroxypropylstärke 60.000-70.000 (Mw) und Polyethylenglykol 8.000 in Wasser [53], so erkennt man in der Lage der Binodalkurven gewisse Unterschiede. In Abbildung 20 zeigt sich, dass die Hydroxypropylstärke schon bei geringeren Konzentrationen ein Zweiphasensystem ausbildet als die Hydroxyethylstärke. Dabei lassen sich diese Abweichungen im Kurvenverlauf auf strukturelle Differenzen der beiden Polymere zurückführen. Bei Hydroxypropyl- bzw. Hydroxyethylstärke handelt es sich um polydisperse Moleküle mit Ketten, bestehend aus α -1,4-glycosidisch verknüpften Glucoseeinheiten und Verzweigungen in α -1,6-Position. Zusätzlich sind an den Glucoseeinheiten entweder Hydroxypropyl- oder Hydroxyethylgruppen angefügt worden (siehe Abb. 21). Dabei unterscheidet man die derivatisierten Stärken anhand ihrer Substitutionsgrade (DS), welche die Anzahl von mit Hydroxyethyl- oder Hydroxypropylgruppen substituierten Glucoseeinheiten der Stärke beschreiben.

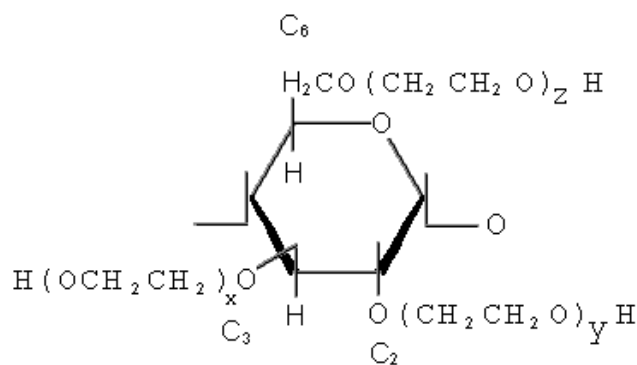


Abb. 21: Beispiel einer Glucoseeinheit mit möglichen Substitutionsstellen für Hydroxyethylgruppen

Die Differenzen im Verlauf der Binodalkurven des Hydroxypropylstärkesystems und der Hydroxyethylstärkesysteme lassen sich wahrscheinlich weniger auf die Molekülgrößen der verwendeten Stärken zurückzuführen, als auf den Substitutionsgrad (DS). Normalerweise

würde man erwarten, dass es aufgrund der Molekülgröße der Hydroxyethylstärken zu stärkeren Wechselwirkungen mit dem PEG kommen kann und dadurch die Separationsneigung höher wäre. Die Molekülgröße der betrachteten Hydroxypropylstärke mit M_w 60.000-70.000 ist wesentlich kleiner, als die der untersuchten Hydroxyethylstärken. Trotzdem zeigt die HPS eine Phasenseparation bei niedrigeren Konzentrationen als die Hydroxyethylstärken. Die im Rahmen dieser Arbeit analysierten Hydroxyethylstärken 130.000, 200.000 und 450.000 weisen jedoch neben der Molekülgröße auch einen höheren Substitutionsgrad von ca. 0,4, 0,5 und 0,7 auf, was einer Substitution, bezogen auf 10 Glucoseeinheiten, von 4, 5 bzw. 7 Hydroxyethylgruppen entspricht. Es ist bekannt, dass es durch das Einführen von Substituenten in das Gerüst der Stärke zu einer strukturellen Aufweitung kommt und dass die erhaltene Struktur in ihren Eigenschaften weniger hydrophil ist. Das Hydroxypropylstärkesystem weist einen DS von 0,03-0,04 auf [53]. Damit ist die Hydroxypropylstärke durch die mehr als 10fach geringere Substitution mit Hydroxypropylgruppen weniger stark strukturell aufgeweitet und damit in Ihren Eigenschaften wesentlich hydrophiler als die Hydroxyethylstärken. Dadurch besteht die Möglichkeit, dass es zu stärkeren Wechselwirkungen zwischen den Etherbrücken des PEGs und der hydrophilen Oberfläche der HPS kommt und infolgedessen die Separation in zwei Phasen bei niedrigeren Konzentrationen eintritt als bei Systemen mit HES.

Vergleicht man den Binodalkurvenverlauf für die neuen HES-PEG-Systeme mit dem Kurvenverlauf für klassische Zweiphasensysteme aus Dextran M_w 180.000-200.000 und PEG 8.000 [1] zeigt sich, dass höhere Konzentrationen an HES und PEG eingesetzt werden müssen, um ein zweiphasiges System entstehen zu lassen (siehe Abb. 20). Bei den Dextranen handelt es sich um langkettige, meist unverzweigte α -1,6-glycosidisch verknüpfte D-Glucoseeinheiten. Betrachtet man die Unterschiede in der Molekülgröße zwischen den Dextranmolekülen und den Hydroxyethylstärken, so findet man auch hier keine Erklärung für die Separation des Dextran-PEG-Systems bei niedrigeren Konzentrationen, da das Dextranmolekül mit einem Molekulargewicht von 180.000-200.000 eine ähnliche Größenordnung beschreibt wie die verwendeten HES. Dextrane und die HES unterscheiden sich jedoch erheblich im Hinblick auf ihre Struktur. Beim Dextran handelt es sich hauptsächlich um eine langkettige Verbindung mit nur sehr wenigen Verzweigungen, wohingegen die HES eine sehr stark verzweigte Struktur besitzt. Eine verzweigte Struktur bietet weniger Wechselwirkungsmöglichkeiten mit anderen Substanzen als die gleiche Struktur in unverzweigter Form. Aus diesem Grund wurde angenommen, dass sich die Unterschiede im Separationsverhalten auf diese strukturellen Unterschiede zurückführen lassen. Dies würde bedeuten, dass sich die Separation des Dextran-PEG-Systems bei niedrigeren Konzentrationen auf stärkere Wechselwirkungen zwischen den beiden Polymeren zurückzuführen lassen.

Im Hinblick auf die HES könnte dies bedeuten, dass die Stärken Strukturen annehmen, welche weniger Oberfläche für Wechselwirkungen mit einem zweiten Polymermolekül wie dem PEG bieten und daher höhere Konzentrationen des Polymers notwendig sind, um das System separieren zu lassen.

In weiteren Untersuchungen von wässrigen HES-PEG-Zweiphasensystemen wurde analysiert, welchen Einfluss das Molekulargewicht der verwendeten Polymere auf das Phasenseparationsverhalten hat. In Abbildung 22 ist zu sehen, dass bei der Verwendung von HES der Sorte 130.000 DS 0,4 oder 200.000 DS 0,5 sich die Lage der Binodalkurven nicht unterscheidet. Die Binodalkurven zeigen einen nahezu deckungsgleichen Verlauf. Dabei zeigen die beiden untersuchten HES eine Besonderheit, die HES 130.000 ist eine nahezu monomodal verteilte Molekulargewichtsfraction aus der polydispersen HES 200.000. Daher ist der ähnliche Verlauf der Binodalkurven leicht erklärbar über die starke Ähnlichkeit der beiden Substanzen.

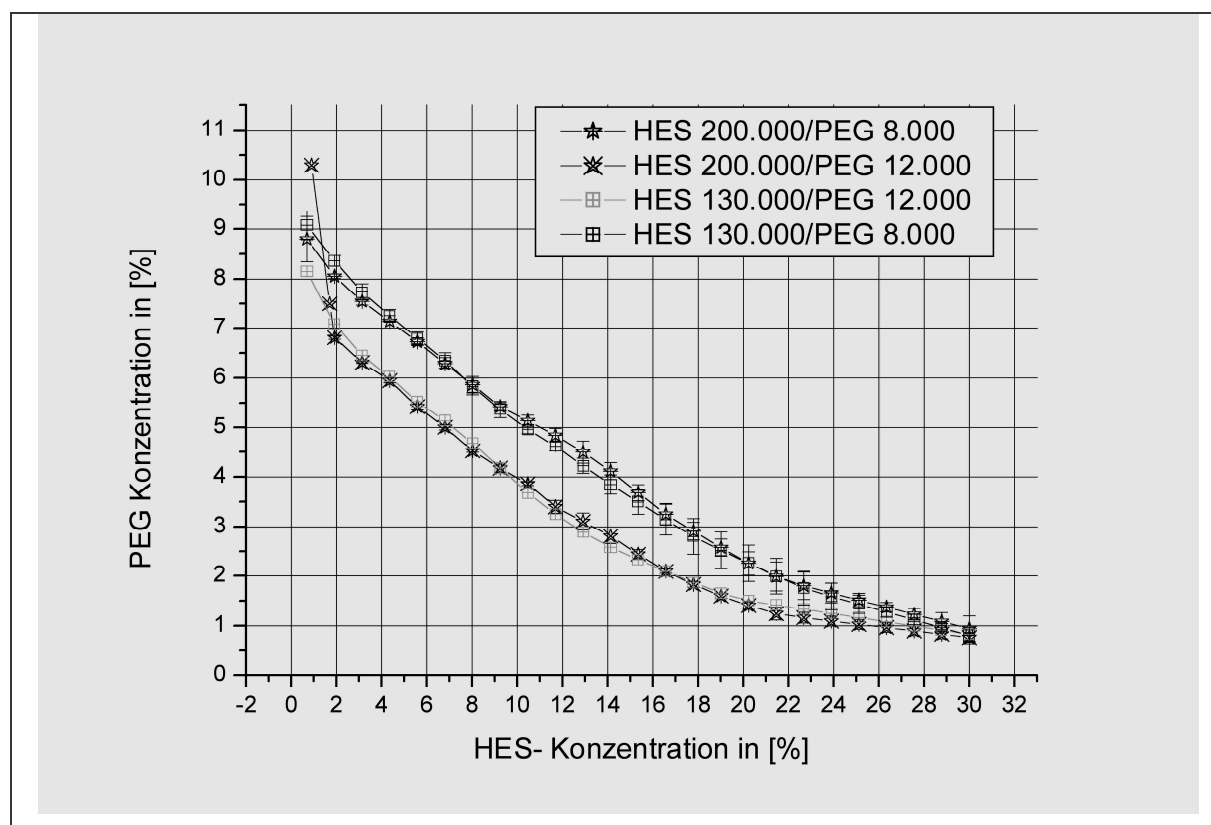


Abb. 22: Binodalkurvenverlauf zweier Zweiphasensysteme aus Hydroxyethylstärke 200.000 bzw. 130.000 und Polyethylenglykol 8.000 bzw. 12.000 ($n=3$)

Betrachtet man hingegen den Einfluss variierender Molekülgrößen des Polyethylenglykols auf die Lage der Binodalkurven, so zeigt sich, dass die Veränderung des Molekulargewichts des eingesetzten Polyethylenglykols von 8.000 auf 12.000 eine deutliche Verschiebung der Binodalkurven zu geringeren Konzentrationen zur Folge hat (siehe Abb. 22). Beim Anstieg des Molekulargewichts des PEG kommt es zu einer Zunahme der Kettenlänge des Moleküls und zu einer Verlängerung der Etherbrücken in der Struktur, welche direkt im

Zusammenhang stehen mit einer Steigerung der hydrophoben Eigenschaften. Durch die Zunahme der hydrophoben Eigenschaften besteht die Möglichkeit von stärkeren Wechselwirkungen zwischen HES und dem PEG, welches zu einer Separation bei niedrigeren Konzentrationen führt.

Aufgrund dieses Ergebnisses und davon ausgehend, dass die Phasenseparation eine Reaktion des Systems zur Verringerung der Wechselwirkungen zwischen den beiden verwendeten Polymeren ist, wird angenommen, dass es zwischen PEG und HES zu strukturell bedingten Interaktionen kommt, welche beeinflusst werden durch den Substitutionsgrad der Moleküle, den Verzweigungsgrad und das Molekulargewicht sowie die Kettenlänge. So stellt sich basierend auf diesen Ergebnissen auch die Frage, welche Strukturen HES und PEG in wässriger Lösung annehmen und ob sich mit Hilfe dieser Strukturen verschiedene Eigenschaften des Zweiphasensystems erklären lassen.

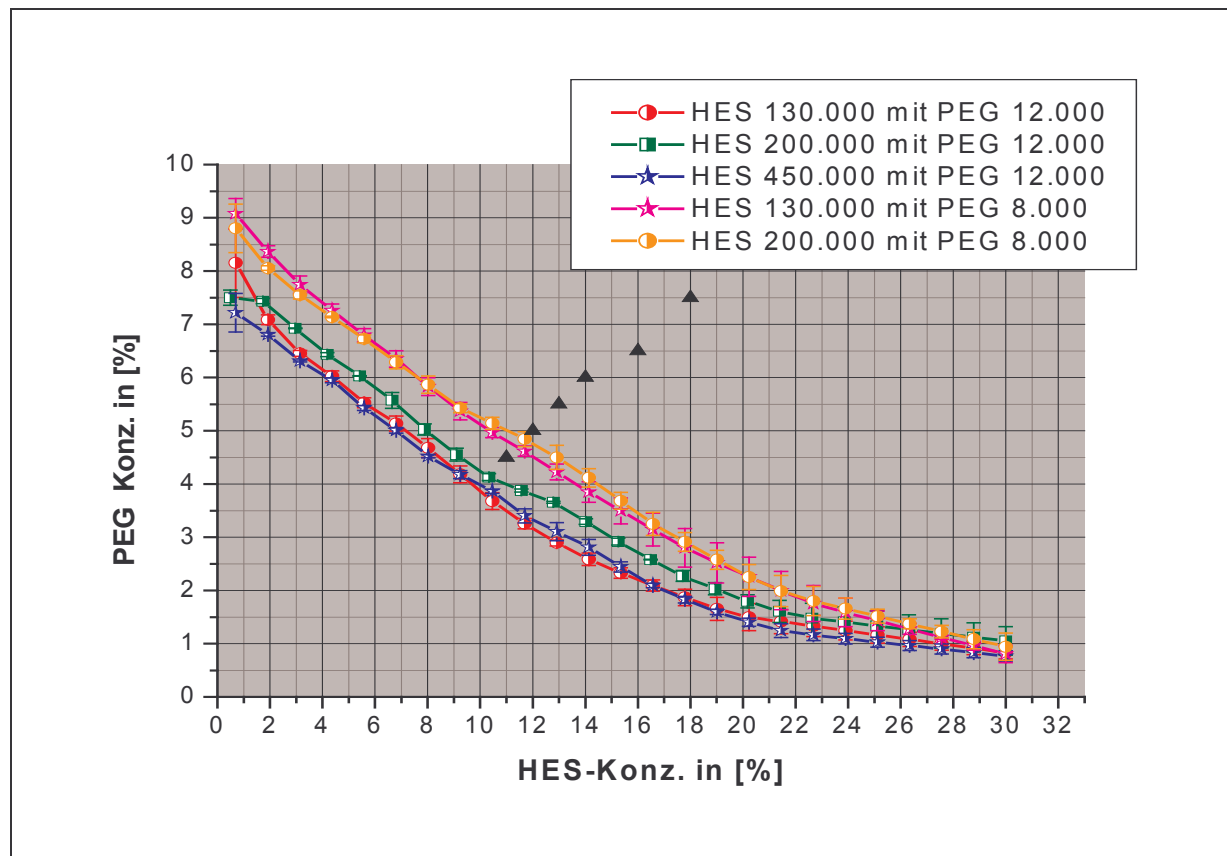


Abb. 23: Binodalkurven der untersuchten HES-PEG-Zweiphasensysteme und ausgewählte Mischungen (▲) für die Charakterisierungen

4.1.2 Physikochemische Charakterisierung des Zweiphasensystems aus HES und PEG

Das neu entwickelte Zweiphasensystem aus Hydroxyethylstärke, Polyethylenglykol und Wasser wurde im Anschluss an die Ermittlung der Phasendiagramme für die weitere Verwendung genauer charakterisiert. Dazu erfolgten Untersuchungen zu

Phasenseparationszeiten, zu den Phasenmengenverhältnissen und zur Bestimmung der Konodenlage. Weiterhin wurden die Lösungsstrukturen von HES und PEG in wässrigen Lösungen näher erforscht.

Die Charakterisierungen der Zweiphasensysteme aus HES und PEG erfolgten unter Verwendung der in Abbildung 23 dargestellten zweiphasigen Mischungen aus PEG 12.000 bzw. 8.000 und HES unterschiedlicher Molekülgrößenfraktion von 130.000, 200.000 und 450.000.

4.1.2.1 Phasenseparationszeiten und Phasenmengenverhältnisse im Zusammenhang mit dem Wassergehalt der Einzelphasen

Zur Bestimmung der Phasenseparationszeit wurde für die hergestellten Mischungen ein neues Verfahren auf der Basis von Pulslasermessungen verwendet. Bei diesem Verfahren erfolgt die Messung die Veränderung der optischen Dichte eines Systems [63]. Zu Beginn der Messung wird ein durch Mischen gleichmäßig trübes System in die Messapparatur eingebracht (siehe Abschnitt 3.2.1.2).

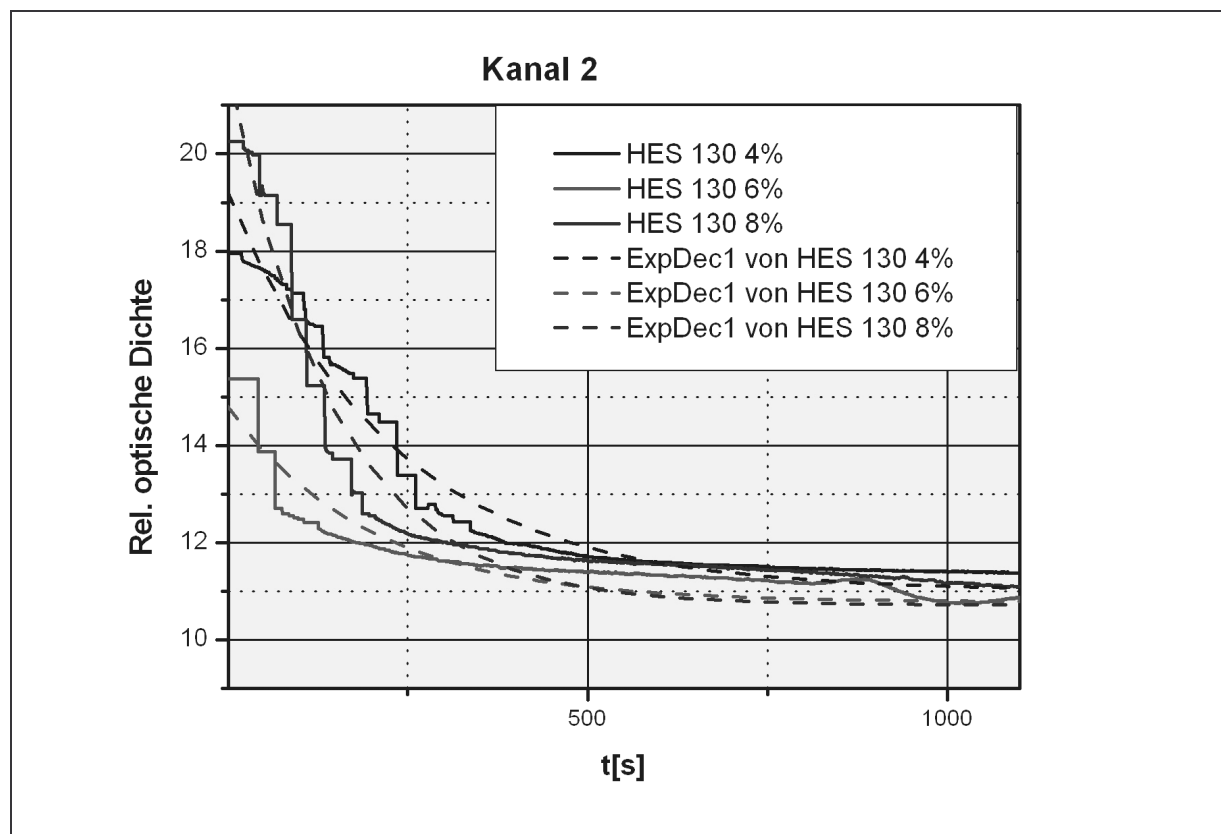


Abb. 24: Kurvenverläufe der Phasenseparation unter Verwendung eines Messverfahrens zur Ermittlung der optischen Dichte

Über zwei Laserdioden wird im oberen Teil und im unteren Bereich der Probe Licht eingestrahlt und über jeweils einen der Lichtquelle gegenüberliegenden Empfänger detektiert. Dabei ist die Intensität des empfangenden Lichtes abhängig von der optischen Dichte der untersuchten Probe. Kommt es zu einer Phasenseparation, ist bei der Messung

eine stetige Änderung der optischen Dichte über das Messgerät zu beobachten. Die Intensität des am Empfänger detektierten Lichtes nimmt dabei zu, da es während des Separationsvorganges zu einer stetigen Reduktion der Trübung kommt. Es kommt durch die Phasenseparation zur Bildung von zwei klaren bzw. nur noch geringfügig getrübbten Einzelphasen. Zum Zeitpunkt der völligen Phasentrennung bleiben die gemessenen Lichtintensitäten konstant. Da sich mit dem verwendeten Messverfahren zwar deutliche Unterschiede im Separationsverhalten ermitteln lassen (siehe Abb. 24), aber die Messmethode keine Bestimmung einer endgültigen Phasenseparationszeit ermöglicht, wurden in diesem Abschnitt die ermittelten Zeitkonstanten der verschiedenen HES-PEG-Systeme miteinander verglichen. Diese Ergebnisse dienten dazu, die verschiedenen Zweiphasensysteme aus HES und PEG näher zu charakterisieren und zu vergleichen. Gleichzeitig wurden durch die Untersuchungen verschiedene Einflussgrößen auf die Phasenseparation ermittelt.

In Abbildung 25 sind die Zeitkonstanten für die PEG und HES Phasen variierender zweiphasiger Systeme dargestellt. Dabei stellt die Abbildung zum einen den Einfluss einer steigenden PEG-Konzentration auf das Separationsverhalten und zum anderen die Unterschiede zwischen Zweiphasensystemen aus verschiedenen Hydroxyethylstärken dar. Das Diagramm (siehe Abb. 25) zeigt die gemessenen Veränderungen der Zeitkonstanten für den oberen Bereich des wässrigen Zweiphasensystems aus PEG und HES. Dieser obere Messbereich entspricht dem gemischten System, welches sich nach und nach durch Sedimentation der HES-reichen Phase zu einer klaren PEG-reichen Phase klärt. Parallel dazu werden die Veränderungen im unteren Bereich der zweiphasigen Mischungen gezeigt. Hier kommt es während der Separation zur Bildung einer HES-reichen Phase. Dabei zeigt das Diagramm in Abbildung 25, dass mit zunehmender PEG-Konzentration von 4 % auf 6% die Zeitkonstante des Separationsvorgangs der oberen Phase abnimmt. Gleichzeitig zeigt die Grafik, dass mit einer weiteren Erhöhung der PEG-Konzentration von 6 % auf 8 % keine weitere Reduktion der Zeitkonstanten für Systeme mit HES 130.000 und 450.000 zu beobachten sind. Stattdessen kommt es zu einem leichten Anstieg der Zeitkonstanten. Im Unterschied dazu weist HES 200.000 einen gleichmäßigen Abfall der Zeitkonstante für die Entmischung im oberen Bereich des Zweiphasensystems mit zunehmender PEG-Konzentration auf. Betrachtet man die Ergebnisse der Untersuchungen zur HES-Phasenbildung im unteren Bereich des Zweiphasensystems durch die Messung der optischen Dichte in Abhängigkeit von der Zeit, so ist festzustellen, dass die ermittelten Zeitkonstanten deutlich andere Werte zeigen. So bleiben sie für Mischungen mit HES 130.000 und 450.000 trotz des Anstieges der Polymerkonzentrationen nahezu unverändert, während man für die HES 200.000 einen deutlichen Anstieg in der Phasenbildungszeit beobachten kann.

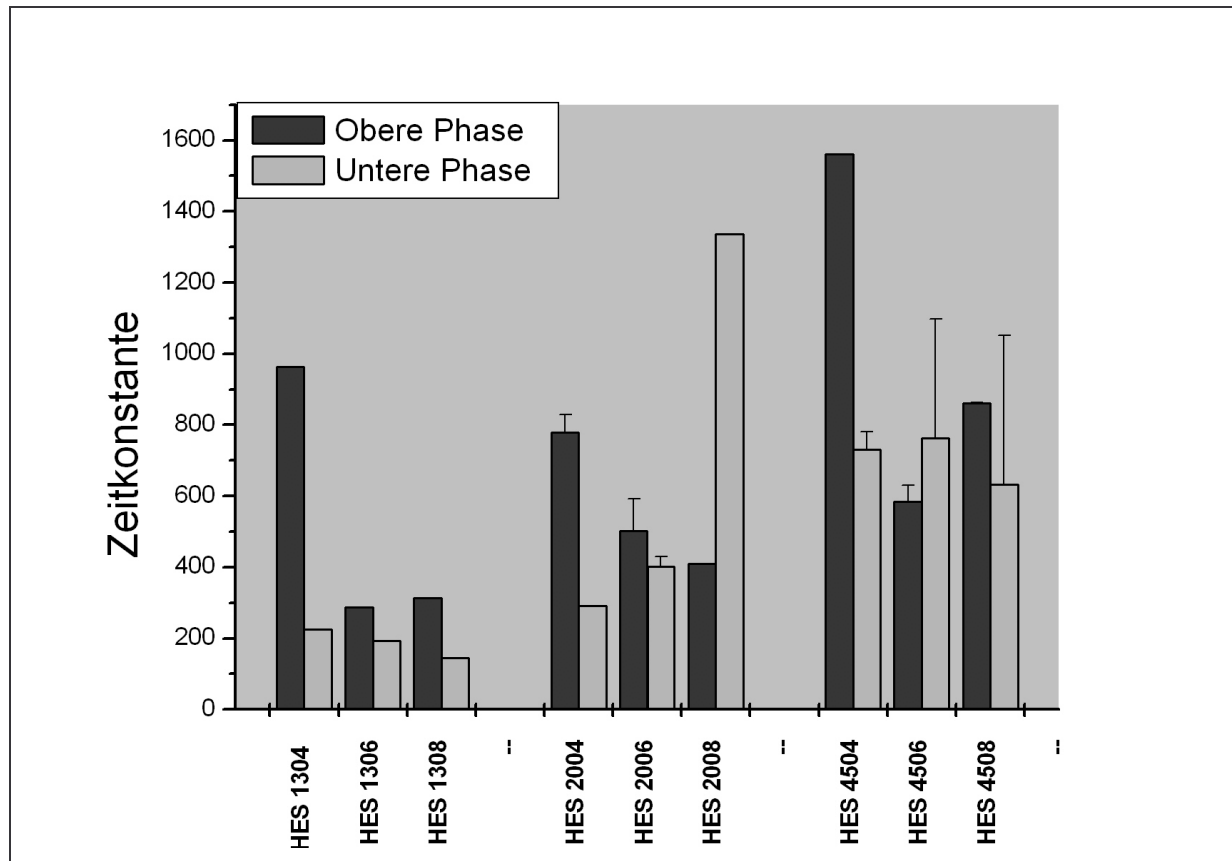


Abb.25: Beeinflussung der Phasenseparationszeitkonstanten durch unterschiedliche HES-Molekülgrößenfraktionen ($n=3$)

Die hohe Zeitkonstante der oberen PEG- reichen Phase aller untersuchten Mischungen bei geringer PEG- Konzentration von 4% lässt sich erklären durch die geringe Polymerkonzentration und durch die Nähe zur Phasengrenze. Aufgrund der niedrigen Konzentration von PEG und HES können weniger Wechselwirkungen zwischen den Polymeren auftreten. Durch die geringeren Interaktionen reduziert sich die treibende Kraft für den Phasenseparationsprozess. Da sich die Mischungen mit 4 % PEG- Anteil nahe der Phasengrenze befinden, wird die langsamere Separation gleichzeitig begünstigt durch zur Phasengrenze hin geringer werdende Dichteunterschiede zwischen den beiden Phasen. Diese geringen Dichteunterschiede werden dadurch verursacht, dass die separierenden Phasen in Richtung Binodalkurve immer weniger Polymere enthalten.

Betrachtet man die Zeitkonstanten des oberen Bereichs des Zweiphasensystems für die Zunahme der PEG- Konzentration auf 6 %, so ist festzustellen, dass die Entmischungszeit reduziert wird. Dies ist zu erklären durch die gesteigerten Wechselwirkungsmöglichkeiten zwischen HES und PEG aufgrund der erhöhten Polymerkonzentration. Durch die höhere Polymerkonzentration kommt es auch zu größeren Dichteunterschieden zwischen den separierten Phasen, welches ebenfalls eine schnellere Separation begünstigt, gleichzeitig steigt jedoch auch die Viskosität an. Mit steigender Polymerkonzentration auf 8% PEG beeinflusst der Anstieg in der Viskosität der PEG- Phase mehr und mehr das

Separationsverhalten. Dies kann dazu führen, dass sich die Separationszeit wieder leicht erhöht, wie man deutlich bei den Systemen aus HES 130.000 und HES 450.000 erkennt. Nur für das System mit HES 200.000 scheint die Erhöhung des PEG-Anteils nicht ausreichend für eine Erhöhung der Entmischungszeit der oberen Phase zu sein. Dieses Ergebnis kann verschiedene Ursachen haben. Da es sich bei der HES 200.000 im Vergleich zu den beiden anderen HES um ein polydisperses Stärkegemisch handelt, ist nicht auszuschließen, dass diese Mischung aus diesem Grunde ein anderes Separationsverhalten zeigt.

Bei der Betrachtung der Zeitkonstanten des unteren Bereichs des Zweiphasensystems ist festzustellen, dass die Bildung einer homogenen HES-reichen Phase mit anderen Zeitkonstanten erfolgte als die Aufklärung des oberen Bereichs des Zweiphasensystems. Alle Ergebnisse bis auf zwei Proben zeigen deutlich eine längere Phasenseparationszeit für die Bildung einer klaren oberen PEG-reichen Phase. Es konnte auch beobachtet werden, dass die untere HES-reiche Phase nach und nach als klare Einzelphase aus der separierenden Mischphase entsteht. Die untere Phase wächst als Einzelphase so lange, bis alle Trübungen in der ehemaligen oberen Mischphase verschwunden sind. Dies bedeutet, dass es sich bei der ermittelten Zeitkonstante für die untere Phase eher um eine Zeit handelt, welche die sedimentierenden HES-reichen Tröpfchen für die Koaleszens benötigen. In den ermittelten Werten für die Bildung einer klaren unteren Phase zeigt sich eine gewisse Gleichmäßigkeit. So zeigen die Untersuchungen für HES 130.000 und 450.000 trotz steigender Polymerkonzentrationen sehr beständige Zeitkonstanten. Aufgrund dieser Ergebnisse wird angenommen, dass die Koaleszens der HES-reichen Tröpfchen zu einer Phase nur gering von der zunehmenden Polymerkonzentration beeinflusst wird. Einzige Ausnahme bilden dazu Systeme aus HES 200.000. Hier kommt es bei der Erhöhung der PEG-Konzentration auf 8% zu einem deutlichen Anstieg der Zeitkonstanten. Dies kann im Zusammenhang mit der abnehmenden Zeitkonstante für den oberen Bereich des Zweiphasensystems nur bedeuten, dass es aufgrund der Erhöhung des Polymeranteils in dem System zu einer schnelleren Separation bzw. Sedimentation der HES-Phase kommt, die HES-Phase jedoch langsamer zu einer homogenen Phase koalesziert. Dies könnte bedeuten, dass die fein verteilten HES-Tröpfchen durch das Vorhandensein von langkettigen und kurzkettigen HES-Molekülen stabilisiert werden.

In der Abbildung 25 ist weiterhin erkennbar, dass die HES 130.000 insgesamt geringere Zeitkonstanten für die Separation aufweist als Systeme mit HES 200.000 oder 450.000. Dies lässt sich nicht über das zunehmende Molekulargewicht von HES erklären. Man würde dann erwarten, dass mit zunehmendem Molekulargewicht die Wechselwirkungen zwischen den Polymeren zunehmen und die Separationszeiten abnehmen. In den Diagrammen zeigt sich jedoch ein gegenteiliges Bild, welches sich durch unterschiedlichen Substitutionsgrade der untersuchten HES erklären lässt. Durch die Erhöhung der Substitution der HES mit

Hydroxyethylgruppen wird zum einen das Molekül aufgeweitet, und es wird weniger hydrophil in seinen Eigenschaften. Ein solches Molekül geht dann weniger Wechselwirkungen mit dem PEG ein. In unserem Beispiel besitzt HES 450.000 den höchsten Substitutionsgrad mit DS 0,7 und zeigt auch die längsten Separationszeiten im Vergleich zu HES 200.000 DS 0,4 und HES 130.000 DS 0,3.

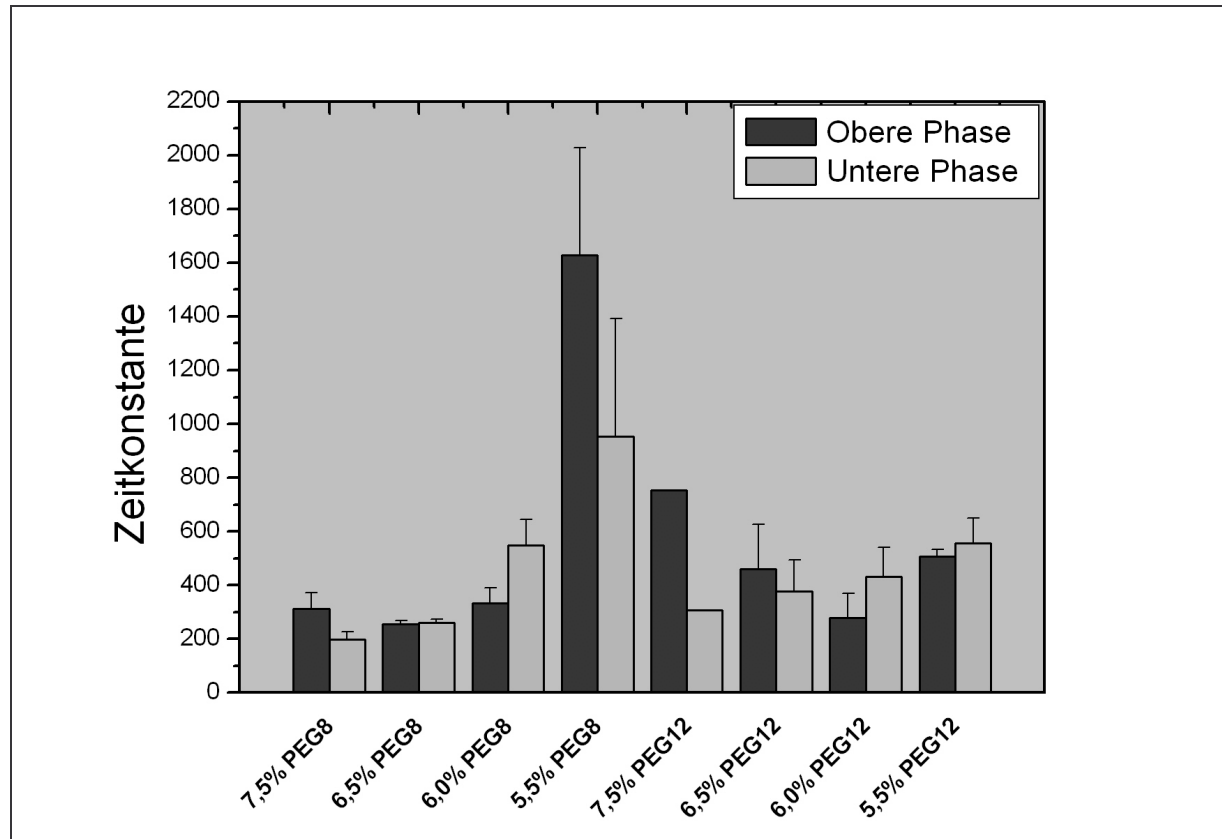


Abb. 26: Einfluss der PEG- Molekülgröße auf die Zeitkonstanten der Phasenseparation ($n=2$)

In einem weiteren Versuchsansatz wurde für Zweiphasensysteme aus HES 200.000 und PEG 8.000 bzw. 12.000 untersucht, welchen Einfluss die Kettenlänge und eine veränderte Konzentration des PEG auf die Phasenseparationszeit besitzen (siehe Abb.26). Durch den Einsatz von zwei verschiedenen Polyethylenglykolen ändern sich zum einen die möglichen Wechselwirkungen zwischen den beiden Polymeren und zum anderen die Viskosität der äußeren Phase (PEG-Phase). Betrachtet man die Ergebnisse in Abbildung 26, so ist festzustellen, dass die ermittelten Zeitkonstanten für die Veränderungen der optischen Dichte für den oberen und unteren Bereich der beiden Zweiphasensysteme sehr ähnliche aber konzentrationsversetzte Verläufe zeigen. Es kommt mit abnehmender Konzentration an PEG erst zu einer Reduktion der Zeitkonstanten und dann zu einem Anstieg. Die beiden zweiphasigen Mischungen aus HES 200.000 mit PEG 8.000 bzw. 12.000 unterscheiden sich jedoch leicht im Ausmaß der Veränderungen der Zeitkonstanten.

Versucht man die dargestellten Ergebnisse in Abbildung 26 zu erklären, so sollte man für die Interpretation die Verschiebung der Binodalkurven durch die Verwendung von PEG mit einem höheren Molekulargewicht berücksichtigen. Mischungen aus HES 200.000 und PEG

8.000 mit 5,5% PEG Anteil befinden sich sehr nah an der Phasengrenze und zeigen aufgrund der geringen Polymerkonzentration eine langsamere Separation in zwei Phasen. Die gleiche Mischung unter Verwendung von PEG 12.000 liegt wesentlich weiter von der Phasengrenze entfernt und separiert dementsprechend schneller. So kann man die erhaltenen Zeitkonstanten nur in leicht verschobener Weise vergleichen und stellt dann fest, dass sich die beiden Systeme im Bezug auf Ihre Zeitkonstanten für die Separation sowohl im Oberen, als auch im Unteren Messbereich kaum unterscheiden.

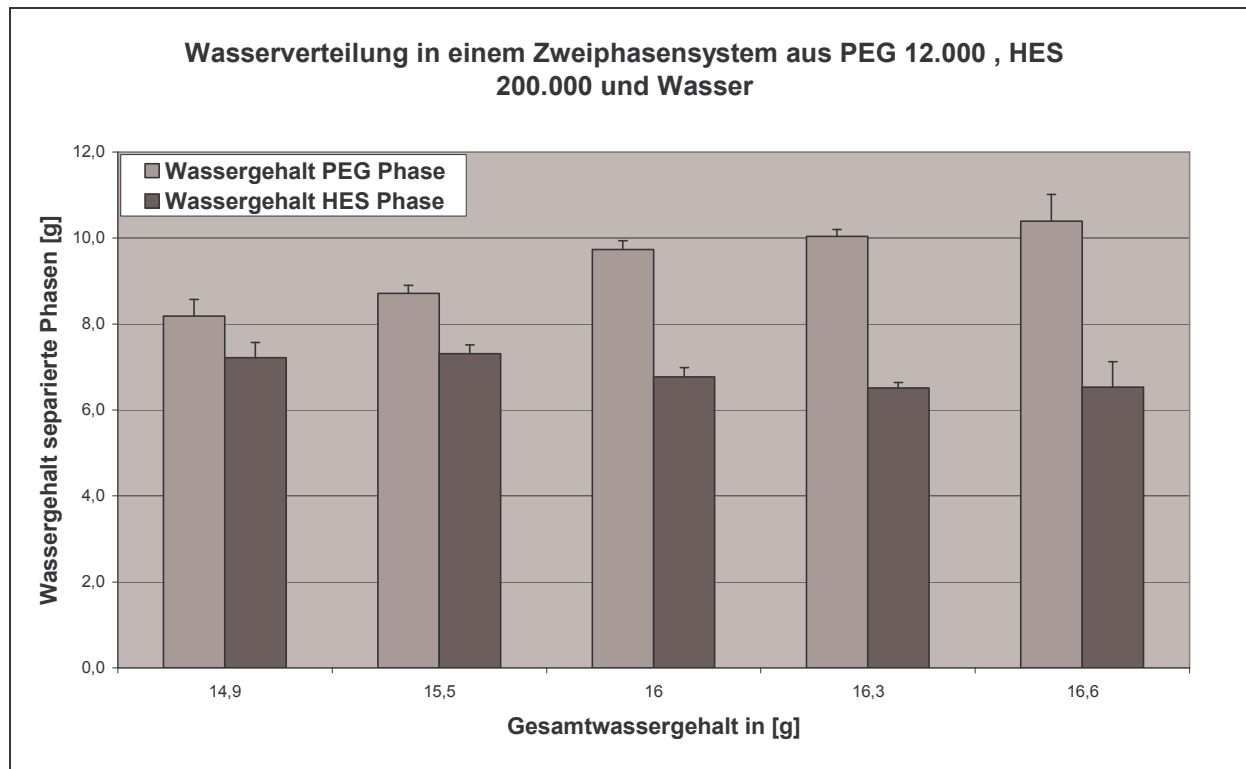


Abb. 27: Wasserverteilung im Zweiphasensystem aus HES 200.000 und PEG 12.000 mit steigendem Polymergehalt siehe Abb.23 (n=3)

Neben der Phasenseparationszeit wurden zur weiteren Charakterisierung der Zweiphasensysteme auch die Wasserverteilung im System und die Phasenmengenverhältnisse der separierten Phasen bestimmt.

Zunächst wurde eine Untersuchung zu den Phasenmengenverhältnissen in wässrigen Zweiphasensystemen aus HES und PEG durchgeführt (Ergebnisse nicht gezeigt), woraus hervorging, dass die PEG-Phase nahezu genauso groß ist wie die HES-Phase. Dabei wurde für die untersuchten zweiphasigen Mischungen HES immer in 2,4fach höherer Masse im Vergleich zum PEG eingesetzt. Anhand dieses Ergebnisses war es von Interesse zu ermitteln, warum die PEG- reiche Phase trotzdem nahezu gleich groß ist im Vergleich zur HES-reichen Phase. Es erfolgten Untersuchungen zum Wassergehalt in den beiden Phasen. In Abbildung 27 ist beispielhaft die Wasserverteilung für ein System aus PEG 12.000 und HES 200.000 dargestellt. Dabei zeigen die Zweiphasensysteme eine vermehrte Wasseranreicherung in der polyethylenglykolhaltigen Phase. Gleichzeitig ist in dem

Diagramm auch der Einfluss einer abnehmenden Polymerkonzentration auf die Verteilung des Wassers im System dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass es mit zunehmendem Wassergehalt und abnehmender Polymerkonzentration zu einer verstärkten Anreicherung des Wassers in der PEG-Phase kommt. Betrachtet man den Wassergehalt in der HES-Phase, so ist festzustellen, dass der Wassergehalt abnimmt mit abnehmender Polymerkonzentration. Mit abnehmender Polymerkonzentration nimmt auch die Anzahl der HES-Moleküle in der Lösung ab, dadurch reduziert sich die für die Solvatation benötigte Menge an Wasser. Im Gegensatz dazu wird das PEG zwar in 2,4fach geringerer Menge eingesetzt, es befindet sich jedoch im Vergleich zu HES die 6fach höhere Anzahl an Molekülen in Lösung. Durch den Wassereinstrom in der PEG-Phase kommt es zum Konzentrationsangleich. Aufgrund des Konzentrationsgradienten zwischen den beiden Phasen ist es umso interessanter, dass die HES-Phase trotz einer geringeren Polymerkonzentration in der Lage ist, eine definierte Wassermenge zu binden. Dies würde bedeuten, dass die Anreicherung von Wasser in der HES-Phase bis zu einem bestimmten Grad energetisch günstiger ist. Dieses Phänomen ließe sich zum einen durch die hydrophilere Oberfläche der HES im Vergleich zum PEG und der daraus resultierenden Wechselwirkungen erklären. Zum anderen könnte man dieses Ergebnis auch über die Begünstigung einer energieärmeren Wasserstrukturierung in der HES-Phase erklären.

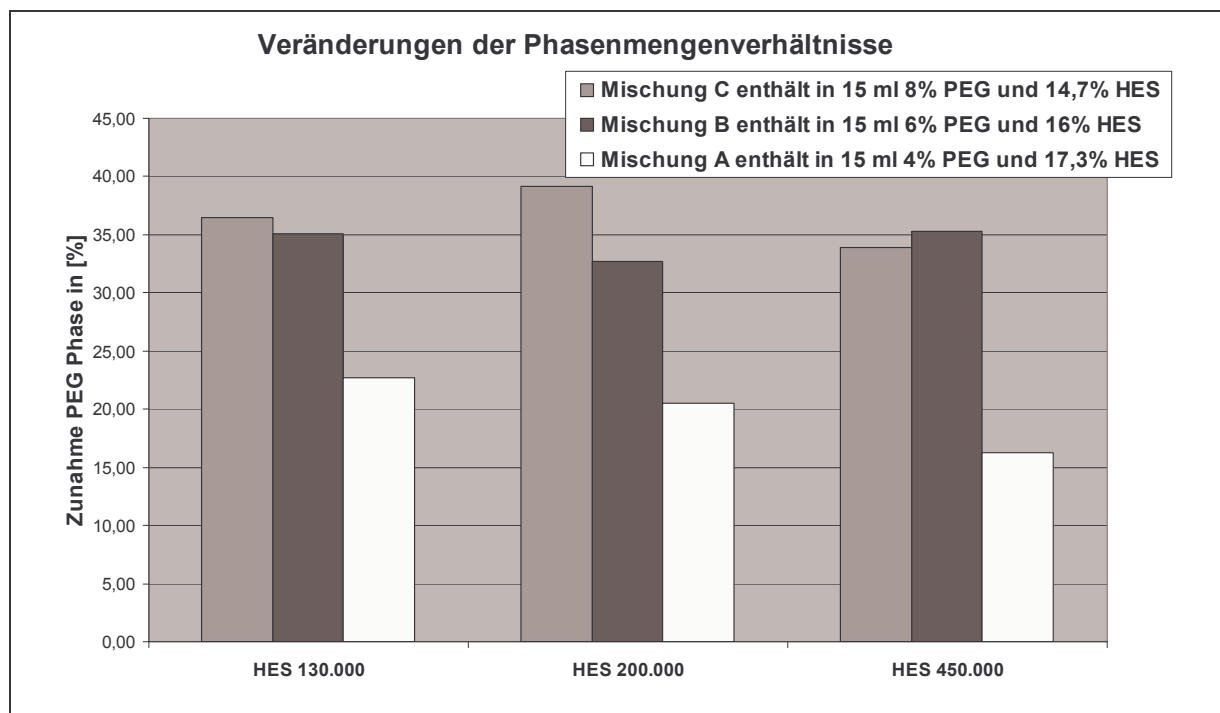


Abb. 28: Zunahme der Phasenmasse der PEG-Phase nach dem Mischen des Zweiphasensystems ($n=1$)

Neben den Untersuchungen zum Einfluss des Wassergehaltes auf die Wasseranreicherung in den Einzelphasen, wurden die Einflüsse einer abnehmenden PEG-Konzentration bei gleichzeitig ansteigender HES-Konzentration auf die Phasenmengenverhältnisse der PEG- und HES-Phase untersucht. In Abbildung 28 sind die Ergebnisse zur Veränderung der

Massen der PEG- Phasen in Prozent dargestellt. Das Diagramm zeigt deutlich, dass mit abnehmender PEG-Konzentration die Masse der PEG-reichen Phase reduziert wird. Die Abbildung 28 veranschaulicht ebenfalls, dass die Veränderungen durch die Abnahme der PEG-Konzentration nur geringfügig zwischen den untersuchten HES variieren. Berücksichtigt man für die Betrachtung dieser Ergebnisse, die vorangegangenen Resultate zu den Konzentrationsverhältnissen im Zweiphasensystem und dem daraus theoretisch resultierenden Wassereinstrom in die PEG-Phase, so wird man erwarten, dass die PEG-Phase trotz abnehmendem PEG-Gehalt in der Masse konstant bleibt. Es zeigt sich aber in Abbildung 28, dass mit abnehmendem PEG-Gehalt und zunehmendem HES-Gehalt die Masse der PEG-Phase abnimmt. Angesichts dieses Ergebnisses kann man davon ausgehen, dass erst die HES-Phase den durch die Zunahme der HES-Konzentration gestiegenen Wasserbedarf absättigt und es dadurch zu einer Abnahme der PEG-Phase kommt. Damit unterstützen diese Resultate die These, dass die Anreicherung von Wasser in der HES-Phase bis zu einem bestimmten Grad energetisch günstiger ist.

4.1.2.2 Konodenlage verschiedener PEG/ HES Zweiphasensysteme

Für die Beschreibung von neuen Zweiphasensystemen benötigt man zur vollständigen Darstellung eines Phasendiagramms neben den Binodalkurven auch die Lage der dazugehörenden Konoden. Dazu wurde für die Ermittlung der Konodenlage der HES-PEG-Zweiphasensysteme eine quantitative Bestimmung des Wassergehaltes durchgeführt. Parallel dazu erfolgte die Entwicklung eines neuen Verfahrens für die quantitative Analyse des PEG-Gehaltes in den separierten Einzelphasen.

Die neue Methode sollte dabei die Detektion von HES [77, 78, 79] neben PEG [80, 81] ermöglichen. Hierbei musste im Vorfeld berücksichtigt werden, dass beide eingesetzten Polymere ähnliche funktionelle Gruppen aufweisen, weshalb viele Quantifizierungsmethoden beide Substanzen erfassen würden. Aus diesem Grunde untersuchte man, ob sich eines der beiden Polymere aus dem Gemisch entfernen oder so verändern ließe, dass die gewählte Nachweismethode nicht gestört werden würde.

Als Nachweismethode wurde eine Reaktion mit Jod und Bariumchlorid gewählt, bei der PEG mit den genannten Bestandteilen einen Farbkomplex bildet (Abb. 29), welcher spektrometrisch bei einer Wellenlänge von 535 nm erfassbar ist. Die nachgewiesenen Mengen an Polyethylenglykol sollten dabei in einem Bereich zwischen 10 µg pro ml und 100 µg pro ml liegen. Unter den angeführten Bedingungen ist jedoch auch HES als Derivat der Wachsmaisstärke in der Lage, mit dem Jod eine Farbreaktion zu einem Jodstärkekomplex einzugehen, welcher im Wellenlängenbereich von 250- 800 nm messbar ist [82] und bei der Detektion von PEG zu Störungen im Messergebnis führt. Aus diesem Grund ist es notwendig, die HES aus dem Gemisch für die Nachweisreaktion zu entfernen. Würde man versuchen, die Stärke durch einen sauren hydrolytischen Aufschluss [77] zu zersetzen,

besteht unter Umständen die Möglichkeit, dass unter den notwendigen drastischen Bedingungen auch Veränderungen am Polyethylenglykol hervorgerufen werden können.

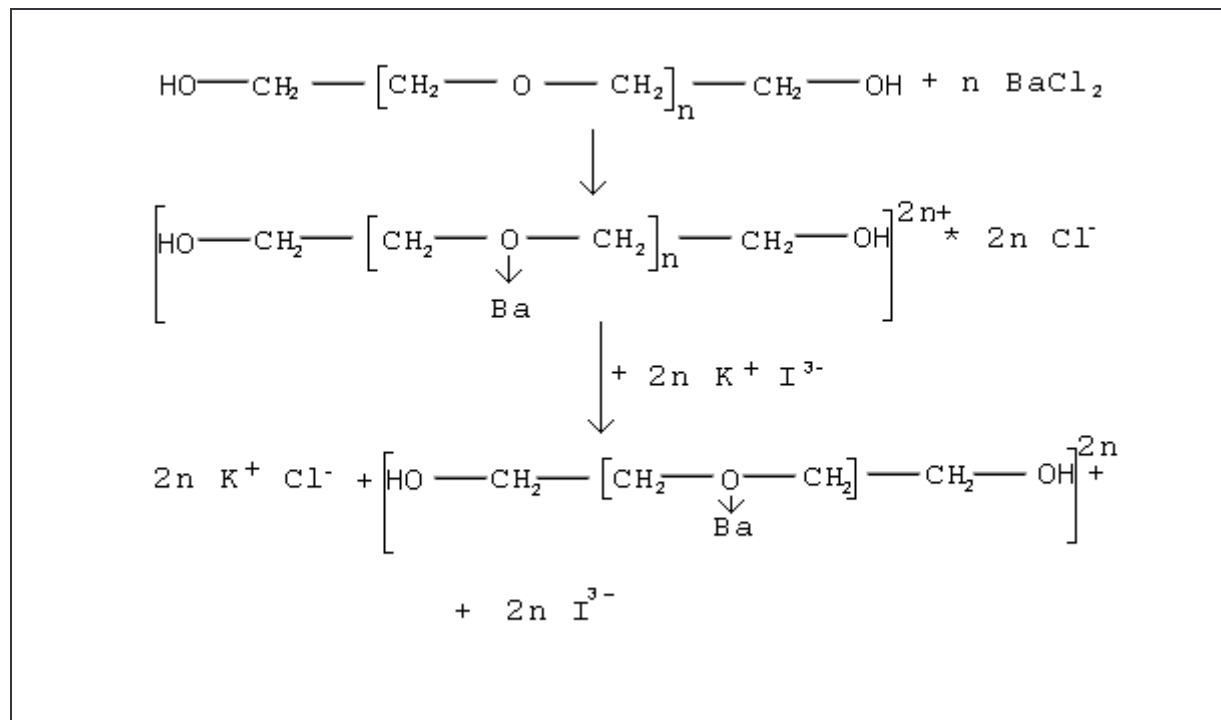


Abb. 29: 1:1 Komplex von Barium und Jodid mit Polyethylenglykol [64]

Aus diesem Grund wurde eine selektive Methode zur Entfernung von HES aus dem HES-PEG-Zweiphasensystem entwickelt. Stärken können im Körper durch entsprechende Enzyme zu kurzkettigeren Zuckermolekülen abgebaut werden. Es wurde untersucht, welche Enzyme unter definierten Bedingungen die HES in so kleine Moleküle aufspalten können, dass die Bildung eines Jod-Stärke-Komplexes nicht mehr möglich ist [76, 83]. Dazu muss das Netzwerk aus α -1,4- und α -1,6- glycosidischen Bindungen soweit aufgetrennt werden, dass weniger als 7,9 Glucoseeinheiten in Amylose miteinander verknüpft sind bzw. 14,8 Glucoseeinheiten in Amylopektin [74]. Da Hydroxyethylstärke aus Wachsmaisstärke hergestellt wird, welche zu 99% aus Amylopektin besteht [74], ist ein Abbau auf unter 14, 8 Glucoseeinheiten notwendig. Dabei ergibt sich die Anzahl der Glucoseeinheiten aus der benötigten Glycosidzahl für die Bindung eines Jodmoleküls.

Für den enzymatischen Abbau von Hydroxyethylstärke untersuchte man drei verschiedene Enzyme. Verwendet wurde eine α -Amylase aus *Bacillus subtilis* [84], welche eine Endohydrolyse der α -1,4-glycosidischen Verknüpfungen bei Polysacchariden mit drei oder mehr α -1,4- verknüpften D-Glucoseeinheiten hervorruft, d.h. das Enzym spaltet die Ketten an bestimmten Stellen in der Kettenmitte. Die α -1,6- glycosidischen Bindungen bleiben dabei von dem verwendeten Enzym unberührt. Die Versuche mit der α -Amylase als Abbauenzym zeigten unter den definierten Reaktionsbedingungen und bei einer verwendeten Wellenlänge von 535 nm eine Abnahme der Absorption des gebildeten Jod-Stärke-Komplexes. Dabei wurde für die Analyse der nachweisbaren HES-Menge in den Proben die gleiche Reaktion

mit Jod und Bariumchlorid verwendet, die für den PEG-Nachweis benutzt wurde. Der identische Versuchsaufbau sollte gewährleisten, dass eine Beeinflussung des PEG-Nachweises nachhaltig ausgeschlossen werden kann. Es wird dabei davon ausgegangen, dass die Abnahme der Absorption zeigt, dass die Stärke durch die α -Amylase in solche Bruchstücke gespalten wird, die zur Bildung eines Jod-Stärke-Komplexes ungeeignet sind. Es zeigte sich auch, dass nach einer halben Stunde kein weiterer Abbau der Stärke und somit keine weitere Abnahme der Absorption messbar ist. Durch die Abbaureaktion mit α -Amylase wird keine vollständige Reduktion der Absorption erreicht, d.h. es befinden sich immer noch Stärkeabbauprodukte in der Lösung, welche einen Jod-Stärke Komplex bilden und damit den PEG-Nachweis stören können.

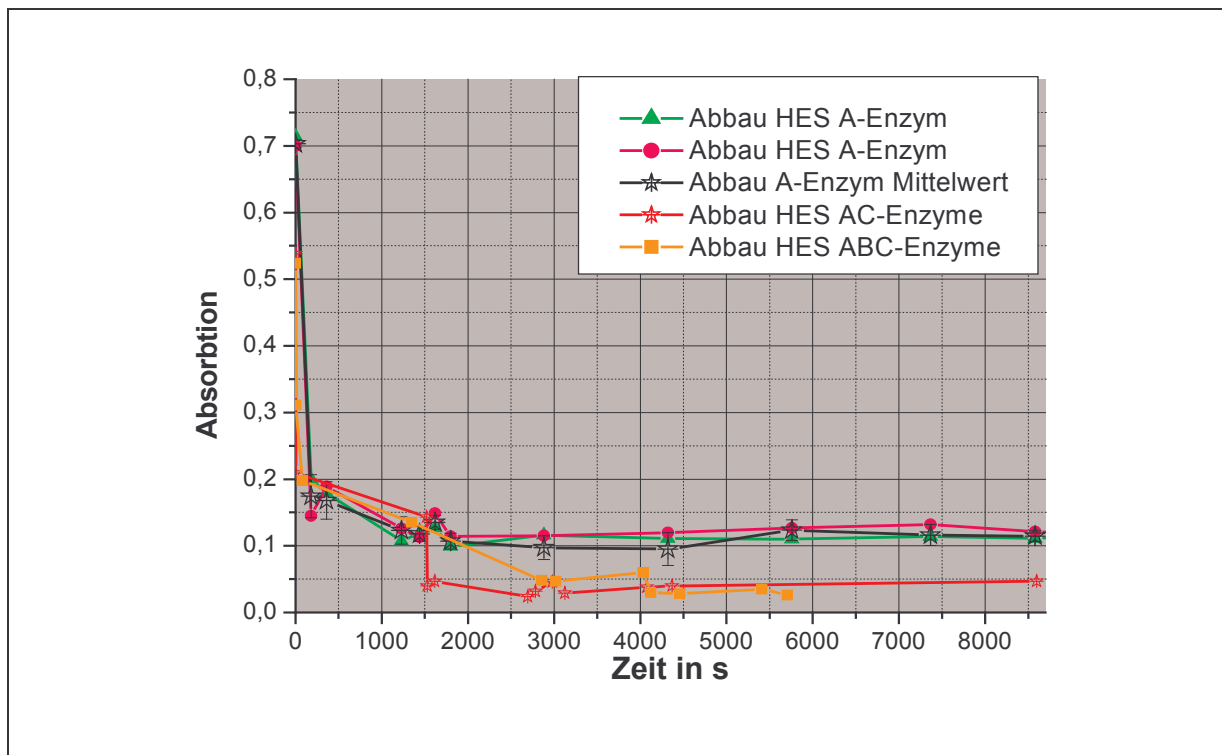


Abb. 30: Versuche zum enzymatischen Abbau von Hydroxyethylstärke mit verschiedenen Enzymmischungen (A= α -Amylase, B=Pullulanase, C=Amyloglucosidase)

Anschließend wurde untersucht, ob der enzymatische Abbau durch Veränderungen der Versuchsbedingungen, der Reaktionszeiten, sowie der α -Amylasen Konzentration optimiert werden kann (siehe Abb. 30). Diese Untersuchungen zeigten keine Verbesserung der Versuchsergebnisse.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde getestet, ob der Zusatz eines oder mehrerer weiterer Stärke abbauender Enzyme eine weitere Reduktion der Absorption ermöglicht [57, 65, 66]. Dazu wurde zum einen eine wärmestabile Pullulanase aus *Klebsiella pneumoniae* (Enzym B) untersucht. Pullulanase ist ein Enzym, welches α -1,6-glykosidische Bindungen hydrolysiert, wie z.B. in Amylopektin und Glykogen zu Maltooligosacchariden. Des Weiteren wurde eine Amyloglucosidase aus *Rhizopus mold.* (Enzym C) eingesetzt, welche die terminalen

Bindungen der α -1,4-verknüpften D-Glucoseeinheiten ausgehend von den nicht reduzierenden Kettenenden hydrolysiert und so β -D-Glucose freisetzt. Durch den Einsatz der Pullulanase verbesserte sich der Abbau der Hydroxyethylstärke nicht, während der Zusatz der Amyloglycosidase die Absorption der enzymatisch abgebauten Stärkelösung reduzierte (siehe Abb. 30, AC- Enzyme). Die ermittelten Absorptionsendwerte für die mit Amyloglucosidase und Amylase abgebaute Hydroxyethylstärke lagen im Bereich der photometrischen Messungenauigkeiten von unter 0,05. Die Untersuchungen zeigten außerdem, dass sich dieses Ergebnis mit oder ohne Zusatz von Pullulanase nicht weiter optimieren ließ (siehe Abb. 30, ABC-Enzyme).

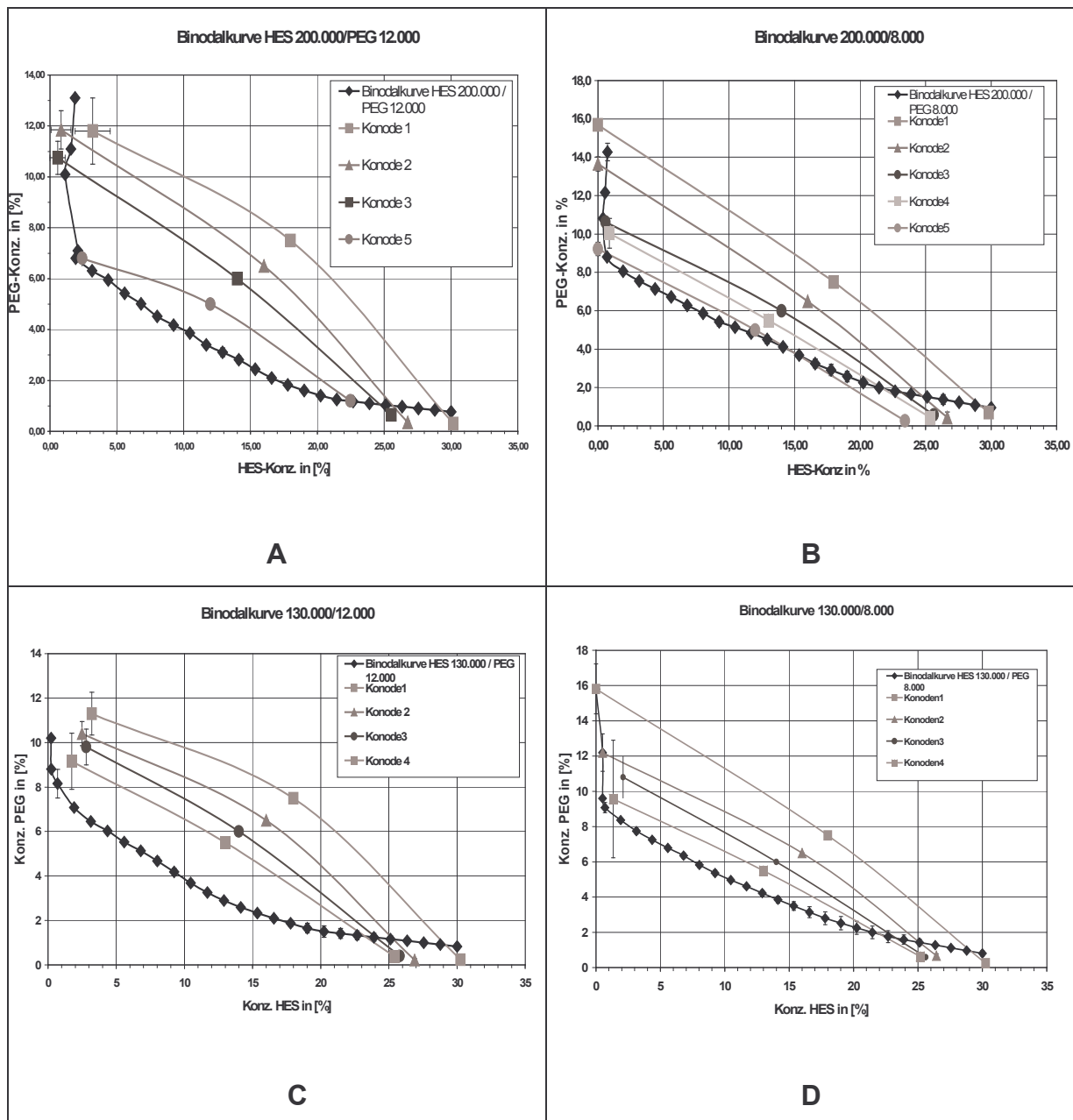


Abb. 31: Darstellung der Binodalkurven und der bestimmten Konoden für Zweiphasensysteme aus HES 130.000 bzw. 200.000 und PEG 8.000 bzw. 12.000 bei Raumtemperatur $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ($n=6$)

Mit Hilfe der entwickelten Methode für den enzymatischen HES-Abbau wurden anschließend unter Nachweis der PEG- und der Wasserkonzentration in den separierten Einzelphasen die Konodenlagen für die Zweiphasensysteme HES 130.000 oder 200.000 mit PEG 8.000 oder 12.000 bestimmt.

Über die Ergebnisse der Wasser- und Polyethylenglykolbestimmung war es möglich, den Massenanteil an Hydroxyethylstärke in den separierten Einzelphasen einer zweiphasigen Mischung zu ermitteln. Die Zusammensetzung der beiden separierten Phasen und der dazugehörigen Mischung wurden mit den dazugehörigen Binodalkurven in den Diagrammen der Abbildung 31 dargestellt.

Dabei zeigen Systeme, die auf einer Konode liegen, eine Separation in Phasen mit gleicher Zusammensetzung und mit variierenden Volumenverhältnissen. Die Bestimmung der Konodenlage erfolgt in Abhängigkeit von der Temperatur. Die hier dargestellten Konoden der untersuchten Zweiphasensysteme wurden bei Raumtemperatur von 20 ° C ermittelt.

Aus den Grafiken ist ersichtlich, dass die Konoden für die einzelnen Zweiphasensysteme (Diagramm A-D) keinen parallelen Verlauf zeigen. Dafür können mehrere Faktoren verantwortlich sein. Als mögliche Ursache für die Unterschiede im Konodenverlauf eines Zweiphasensystems ist zu berücksichtigen, dass es sich bei den untersuchten Zweiphasensystemen um Dreistoffgemische handelt, wobei die Mischung zweier dieser Stoffe immer durch die Anwesenheit des dritten Stoffes beeinflusst wird. Genau genommen sind Zweiphasensysteme jedoch nicht nur als Dreistoffsysteme zu betrachten, sondern als Systeme mit einer Vielzahl von Komponenten, weil die eingesetzten Polymere häufig polydisperse Verbindungen sind [1]. So ist es denkbar, dass während der Phasenseparation bestimmte Fraktionen des eingesetzten HES-Gemisches unterschiedlich separieren und sich in der einen oder anderen Phase anreichern. Die Polydispersität der Proben kann zur Folge haben, dass die Regel „Alle Punkte auf einer Konode zeigen die gleiche Zusammensetzung, aber unterschiedliche Mengenverteilungen“ [22] nicht mehr gilt und erklärt die gemessenen Unterschiede im Konodenverlauf.

Eine weitere Größe, welche die Abweichungen in den ermittelten Konodenverläufen verursachen kann, sind die verwendeten Nachweismethoden. Jede Nachweismethode ist auch fehlerbelastet und kann damit das Ergebnis stark beeinflussen. So ergeben sich bei der Bestimmung des Wassergehaltes Wiederfindungsraten von 100,3-102,4 Prozent, woraus zu schließen ist, dass die untersuchten Proben teilweise hygroskopisch Wasser aus der Umwelt aufgenommen haben. Eine weitere mögliche Fehlerquelle ist der Verdünnungsschritt für den HES-Abbau und die PEG-Nachweisreaktion. Hierbei werden die Proben der HES-Phase 1:100 und die Proben der PEG-Phase 1:1000 verdünnt. Durch diesen großen Verdünnungsschritt im Zusammenhang mit der klebrigen Konsistenz der zu verdünnenden Probe besteht die Gefahr, dass in den untersuchenden Proben ein zu niedriger PEG-Gehalt

bestimmt wird. Die für den entwickelten PEG-Nachweis der verdünnten Zweiphasensysteme ermittelten Wiederfindungsraten lagen für Systeme aus Hydroxyethylstärke 130.000 bei 60,8 - 86,7% und für Systeme mit Hydroxyethylstärke 200.000 bei 79,7 - 104,3 %. Aufgrund der gefundenen Wiederfindungsraten ist es nicht möglich, für Phasendiagramme eine endgültige Aussage zu dem Verlauf der Konoden zu machen.

4.1.3 Untersuchung der Lösungsstrukturen von HES und PEG

Für die Entstehung eines Zweiphasensystems durch das Mischen zweier in Wasser gelöster Polymere werden verschiedene Ursachen diskutiert. Als Ursache für die Phasenseparation werden verschiedene Theorien erörtert. So wird angenommen, dass die durch Polymere bedingte Änderung in der umgebenen Wasserstruktur die Phasenseparation begünstigt. Weitere Studien befassen sich mit den Interaktionen zwischen den verwendeten Makromolekülen, welche zu einer Zweiphasenbildung führen sollen (siehe Abschnitt 2.1). Ausgehend von dieser Situation entstand die Überlegung, dass es möglich ist, weitere Aussagen zu der Zweiphasenbildung des HES-PEG-Systems zu treffen und bestimmte beobachtete Phänomene zu erklären, wenn HES und PEG in wässrigen Milieu Strukturen annehmen, welche die Wechselwirkungen zwischen den beiden Polymeren begünstigen.

Die Lösungsstruktur eines Polymers in einem definierten Medium ist abhängig vom Aufbau und den Eigenschaften des untersuchten Makromoleküls sowie von äußeren Bedingungen wie der Wahl des Lösungsmittels, der Temperatur und der Konzentration. Für die Ermittlung der Lösungsstruktur der in dieser Arbeit verwendeten Polymere über die Mark-Houwink-Sakurada-Beziehung (siehe Abschnitt 3.2.2.5) mussten die Ergebnisse aus den viskosimetrischen Messungen einer Reihe mathematischer und grafischer Umformungen unterzogen werden.

Die Messung der Viskosität erfolgte mittels Kapillarviskosimeter an stark verdünnten Polymerlösungen. Dazu wurden PEGs verschiedener Kettenlänge von 6.000, 8.000 und 12.000 untersucht, sowie die HES 130.000, 200.000 und 450.000, wobei die eingesetzten Stammlösungen in ansteigenden Verdünnungen vermessen wurden. Für die untersuchten Polymerlösungen wurden die Dichten bestimmt. Dabei lag die Dichte für die untersuchten PEG-Lösungen in der Konzentration von 0,01 % bis 1,0 % bei 0,998-0,9997 g/cm³ und damit in der gleichen Größenordnung wie die Dichte des verwendeten Wassers. Ähnliche Ergebnisse wurden für die untersuchten HES 130.000, 200.000 und 450.000 mit Dichten von 0,998-1,0005 g/cm³ ermittelt. Damit gilt für den untersuchten Konzentrationsbereich, dass die Dichte der Mischung geteilt durch die Dichte des Lösungsmittels $\rho_{\text{Misch.}} / \rho_{\text{Lösungsm.}} \approx 1$ beträgt.

Weil sich das Dichtenverhältnis für die Berechnung der Viskosität auf den Faktor 1 reduziert, vereinfacht sich die Formel für die relative Viskosität (η_{rel}) auf ein einfaches Zeitverhältnis (Formel 24). Dabei ergeben sich die Viskositäten der Mischung bzw. des Lösungsmittels aus

der Zeit, welche die entsprechende Flüssigkeit für das passieren einer definierten Kapillare benötigt, und der mediumsspezifischen Dichte.

$$\eta_{rel} = \eta_{Misch.} / \eta_{Lösungsm.} \quad (23)$$

$$\eta_{rel} = t_{Misch.} / t_{Lösungsm.} \quad (24)$$

Mit Hilfe der ermittelten Zeiten für das passieren einer definierten Kapillare eines Ubbelohde-Viskosimeters wurden neben der relativen Viskosität auch die konzentrationsabhängigen Viskositäten wie die spezifische und die reduzierte Viskosität berechnet.

Um die intrinsische Viskosität $[\eta]$ der verwendeten Polymere PEG und HES zu ermitteln, wurde die reduzierte Viskositäten der Polymerlösungen im Huggins-Plot grafisch gegen die Konzentration aufgetragen und über Extrapolation der Schnittpunkt mit der y-Achse ermittelt. Der Schnittpunkt mit der y-Achse stellt den Wert der intrinsischen Viskosität dar (siehe Abb.32). Dabei ist die intrinsische Viskosität bzw. Grenzviskosität abhängig von Schwankungen in der Form und Verzweigungsdichte der untersuchten Moleküle, sowie in Solvatationsunterschieden, resultierend aus Unterschieden im Substitutionsgrad und Substitutionsmuster. Wird eine Substanz betrachtet, sollte hier eine einheitliche Form und Verzweigungsdichte vorliegen, um eindeutige Aussagen über die Lösungsstrukturen machen zu können [67].

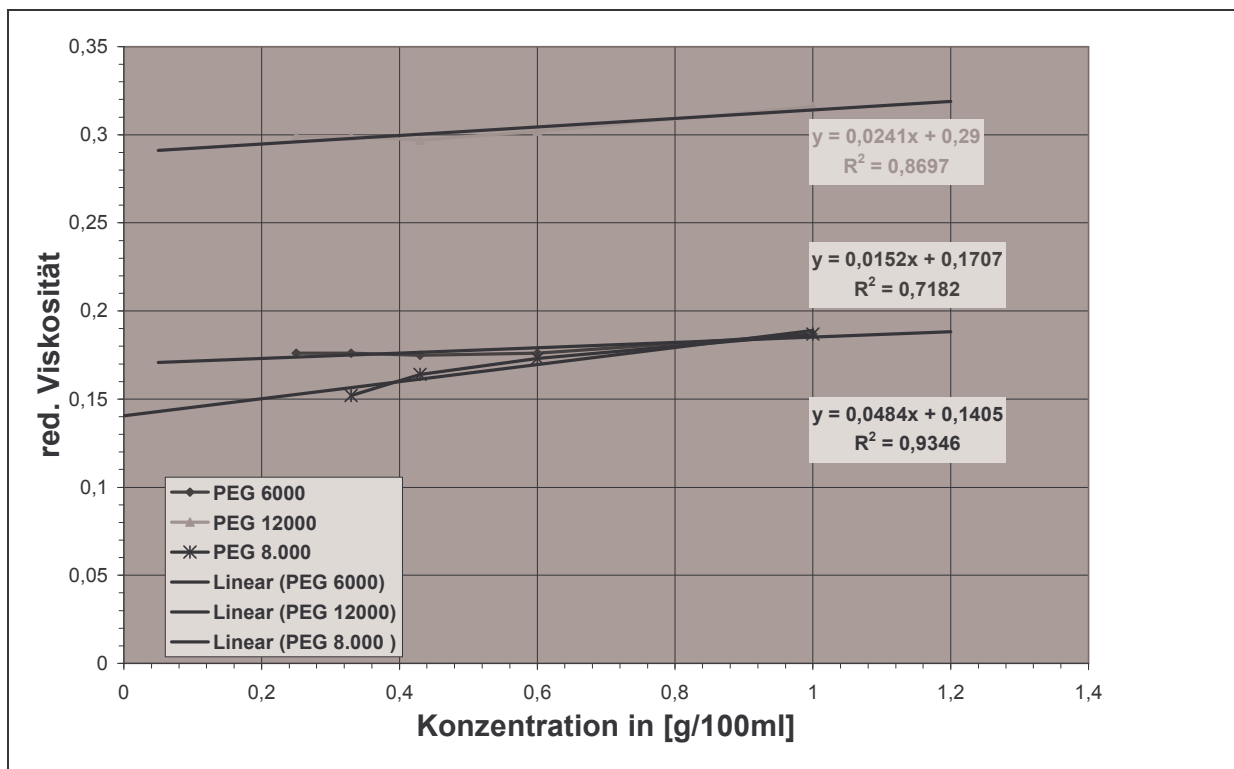


Abb. 32: Huggins-Plot von PEG unterschiedlicher Molekülgröße

Wie in Abbildung 32 ersichtlich, weisen die Graphen von PEG 6.000 und PEG 12.000 recht ähnliche Steigungen auf. Die Funktionen von PEG 6.000 und PEG 8.000 zeigen dagegen einen überschneidenden Verlauf, welcher sich möglicherweise erklären ließe über die sehr nahe befindlichen mittleren Molekulargewichte der Proben von 6.000 g/mol und 7.000-9.000

g/mol . Dabei zeigen die Daten zur Molekulargewichtsverteilung der PEGs, dass PEG 6.000 eine sehr enge Molekulargewichtsverteilung aufweist und die Verteilungen von PEG 8.000 zu PEG 12.000 mit steigender Molekülgröße breiter werden (Daten von BASF).

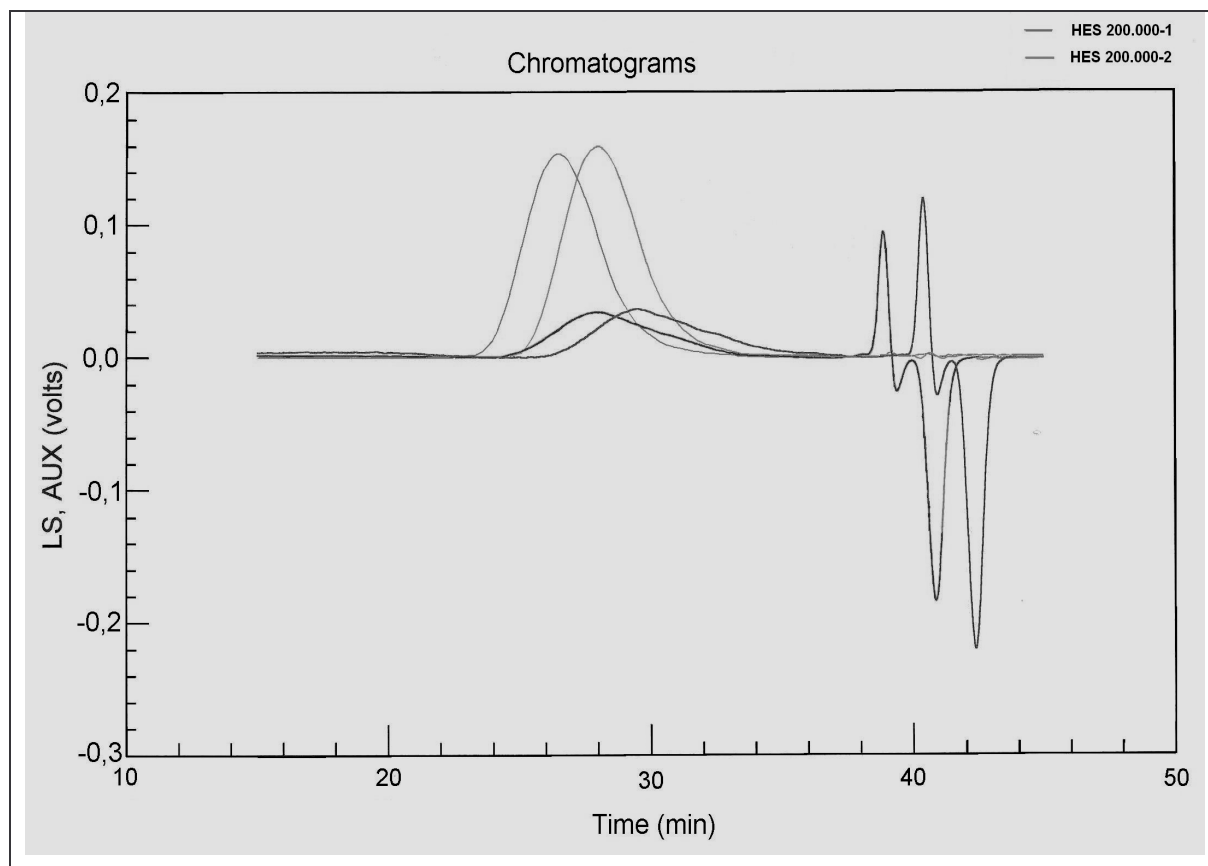


Abb. 33: GPC-Chromatogramm von HES 200.000 / 0,5

Die mit Hilfe des Huggins-Plots ermittelten Werte für die intrinsische Viskosität von PEG und HES wurden anschließend logarithmiert und im Mark-Houwink-Plot gegen den Logarithmus der dazugehörigen Molekülgröße grafisch aufgetragen (siehe Abb. 32). Über die Ermittlung der Geradengleichung $[\eta] = k_{\eta} \cdot M^a$ durch Extrapolation wird die Steigung der Gerade zugänglich und damit der Exponent a , welcher die Lösungsstruktur des Polymers beschreibt. Für die korrekte Ermittlung der Parameter K und a ist eine sehr hohe Güte der untersuchten Polymerfraktionen notwendig. Deshalb ist es erforderlich, für die Vermessung möglichst Substanzen mit einer sehr engen Molekulargewichtsverteilung zu verwenden.

Die Daten zur Molekulargewichtsverteilung der hier untersuchten Substanzen wurden den Produktspezifikationen entnommen und darüber hinaus teilweise durch Gelpermeationschromatografische Messungen kontrolliert (siehe Abb. 33). Diese Kontrollmessungen zur Molekulargewichtsverteilung ergaben ähnliche Werte für die HES wie in den Spezifikationen angegeben [11, 85]. In Abbildung 33 ist außerdem zu erkennen, dass die HES 200.000 nicht die gewünschte enge Molekulargewichtsverteilung aufweist - im Gegensatz zur HES 130.000 und 450.000. Trotzdem wurden die Untersuchungen zur Bestimmung der Lösungsstrukturen fortgeführt.

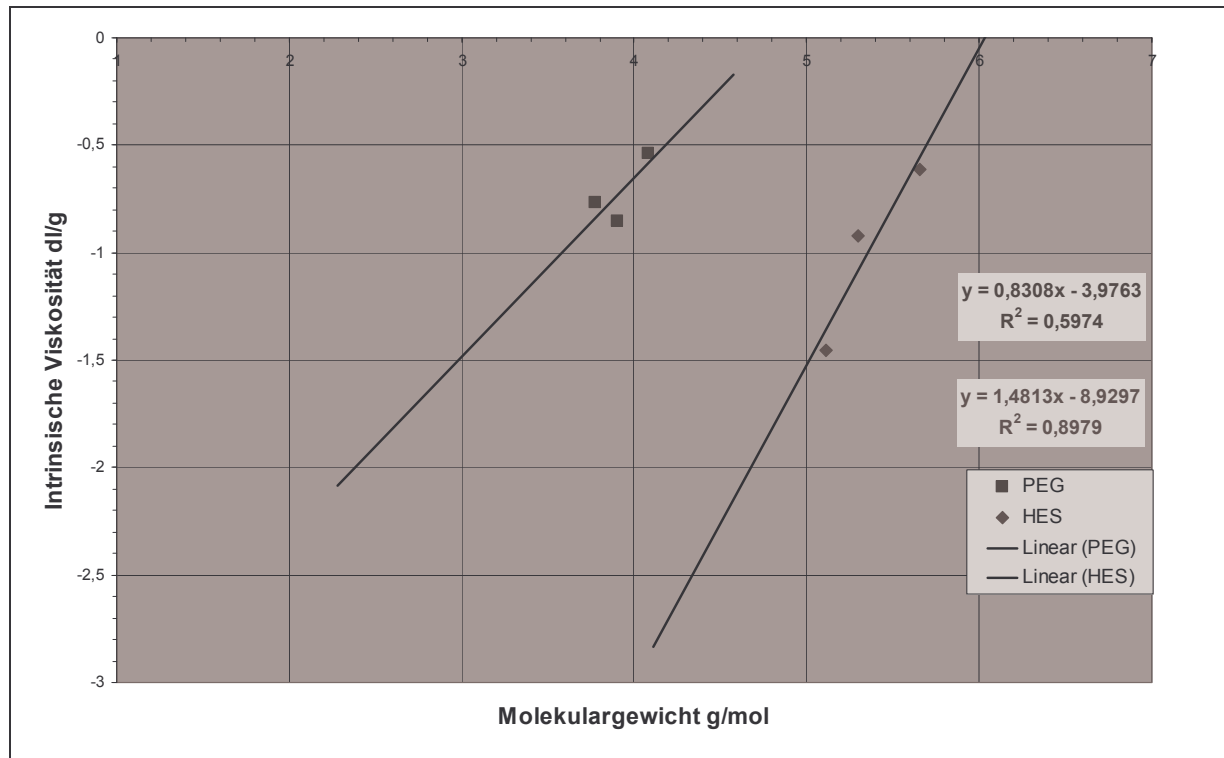


Abb. 34: Mark-Houwink-Plot von Hydroxyethylstärke und Polyethylenglykol

Bei den HES ergab sich mit Hilfe des Mark-Houwink-Plots für den Exponenten a ein Wert von 1,48 (siehe Abb.34), was der Form eines halbflexiblen Stäbchens entspricht.

Dieses Ergebnis ist allerdings mit Vorsicht zu betrachten, zum einen aufgrund der relativ breiten Molekulargewichtsverteilung der verwendeten HES 200.000 und zum anderen werden die Ergebnisse durch weitere Größen beeinflusst, wie den Verzweigungsgrad und dem Substitutionsgrad. Dabei verstärkt sich mit steigendem Substitutionsgrad der Probe die Aufweitung des Moleküls, und die Solvation des Moleküls kann zunehmen [85]. Abhängig von den Änderungen des Substitutionsgrades und der Solvation verändert sich auch die Lösungsstruktur der untersuchten Polymere. Durch die Verwendung von HES mit unterschiedlichem Substitutionsgrad ergibt sich eine Mittelung der möglichen Lösungsstrukturen dieser Substanzen. Für selektivere Aussagen wäre es erforderlich, einzelne Fraktionen aus einer HES-Charge aufzutrennen und zu untersuchen.

Für PEG ermittelte man die Lösungsstruktur eines teilweise gestreckten Polymerknäuels. Dabei stellt sich für das PEG die Beurteilung der Ergebnisse etwas einfacher dar, weil es sich hier um unverzweigte Moleküle handelte. Bei der Betrachtung ist zu berücksichtigen, dass die untersuchten Polyethylenglykolproben unterschiedlich breite monomodale Molekulargewichtsverteilungen aufweisen. Man kann jedoch davon ausgehen, dass die ermittelte Lösungsstruktur des Polyethylenglycols mit hoher Wahrscheinlichkeit dem tatsächlichen Zustand in wässriger Lösung entspricht.

Betrachtet man die ermittelte Lösungsstruktur für PEG als teilgestrecktes Polymerknäuel, so kann man daraus den Schluss ziehen, dass in wässriger Lösung Wechselwirkungen sowohl

mit den hydrophilen Endgruppen des PEGs, als auch mit den weniger hydrophilen Ethergruppen möglich sind. Für die ermittelte Struktur der HES als halbflexibles Stäbchen wird eine Anordnung der hydrophilen Gruppen an der Oberfläche des Stäbchens angenommen. Gleichzeitig wird ein halbflexibles Stäbchen einen höheren räumlichen Platzbedarf haben als teilgestrecktes Polymerknäuel.

4.1.4 Untersuchung des Phasenseparationsverhalten von Proteinen und Salzen in Zweiphasensystemen aus Hydroxyethylstärke, Polyethylenglykol und Wasser

Im Rahmen der Charakterisierung des wässrigen Zweiphasensystems aus HES und PEG wurden die Separationseigenschaften von Proteinen analysiert. Dabei zielte diese Untersuchung speziell auf die Ermittlung des Phasenseparationsverhaltens von definierten Proteinen in dem Zweiphasensystem und den Möglichkeiten zur Steuerung der Separationseigenschaften der verwendeten Proteine. Zielstellung dieser Analysen war, eine hohe Anreicherung der untersuchten Proteine in der HES-Phase zu begünstigen. Eine Anreicherung in der HES-Phase gilt als Grundvoraussetzung für den Inkorporationsschritt bei der Herstellung von proteinbeladenen Mikropartikeln. Bei dem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Herstellungsverfahren erfolgt die Polymerisation der inneren HES-haltigen Phase zu Mikropartikeln in einem wässrigen Zweiphasensystem. Dabei ist es für die Proteinbeladung der Mikropartikel notwendig, dass sich das eingesetzte Peptid in der polymerisierten Phase befindet. Dadurch kann sichergestellt werden, dass nur geringe Mengen an Protein durch den Herstellungsprozess verloren gehen, was sich bei der späteren Beladung der Mikropartikel mit Pharmaproteinen positiv auf die Kosten auswirkt. Für die Untersuchung des Separationsverhaltens wurden die Proteine Hen-Egg-White-Lysozym (HEW-Lysozym) und Bone-morphogenetic-protein-2 (BMP-2) verwendet [86].

4.1.4.1 Separationsverhalten von Lysozym im wässrigen Zweiphasensystem aus HES und PEG und der Einfluss von Salzzusätzen

Für die Untersuchung des Separationsverhaltens von niedermolekularen Proteinen im wässrigen Zweiphasensystem wurde die jeweilige Anreicherung von Lysozym in den HES- und PEG-Phasen bestimmt. Dabei wurde das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Zweiphasensystem untersucht, bei dem es sich um ein Dreistoffgemisch aus bidestilliertem Wasser, HES und PEG handelt. In weiteren Versuchen veränderte man das Zweiphasensystem durch den Austausch des Wassers durch Elektrolytlösungen, um damit die Einflüsse von Salzen und des pH-Wertes auf die Separation der Proteine zu ermitteln. Dabei können Veränderungen des pH-Wertes und die Art des verwendeten Salzes die Ladungen des Proteins und damit die Wechselwirkungsmöglichkeiten mit den Polymeren im

Zweiphasensystem beeinflussen. Die eingesetzten Salze wurden in Anlehnung an die Hofmeister-Serie ausgesucht [26].

HEW-Lysozym verwendete man speziell, da es mit einer Molekülgröße von 14,2-14,6 kDa ein geeignetes Modellprotein darstellt für die Untersuchung des Phasenseparationsverhaltens von sehr kleinen Proteinen. Der isoelektrische Punkt von Lysozym liegt zwischen pH 10,5 und 11.

Für die Untersuchung des Phasenseparationsverhaltens wurden Zweiphasensysteme, basierend auf gelöstem Polyethylenglykol 12.000 und HES 200 / 0,5, in unterschiedlichen Elektrolytlösungen hergestellt. Dabei wurden die Salzlösungen so eingesetzt, dass sie unterschiedliche pH- Bereiche abdecken, in denen das verwendete Protein noch stabil und funktionsfähig ist, das heißt pH-Werte von 5,0 bis pH 8,0. Als Vergleichsgröße für die ermittelten Versuchsergebnisse wurde der Phasenseparationskoeffizient berechnet.

Der Phasenseparationskoeffizient k wurde definiert als: $k_{sep} = \frac{c_{PEG}^{Protein}}{c_{HES}^{Protein}}$ (25)

Die ersten Separationsuntersuchungen für Lysozym in einem rein wässrigen Zweiphasensystem ohne Elektrolytzusatz und bei pH 7,0 zeigten, dass sich das Lysozym in siebenfach höherer Konzentration ($k_{sep} = 7,4$) in der Polyethylenglykolphase anreicherte als in der Hydroxyethylstärkephase. Dabei wurden in den beiden separierten Einzelphasen insgesamt 94,8% des eingesetzten Lysozyms wiedergefunden.

Anschließend wurde untersucht, ob der Einsatz von Puffersalzen die Separationseigenschaften von Lysozym verändern. Dazu wurden pH-Werte im Bereich von 5,0 bis 8,0 untersucht. Eingesetzt wurden 20 mM Pufferlösungen von Natriumacetat pH 5,00, Natrium- und Kaliumphosphat pH 7,00 und Natriumhydrogencarbonat pH 8,00 und 8,50.

Elektrolytsalz	pH-Wert	Separationskoeffizient k_{sep}	Anzahl der Messungen
20 mM Natriumacetat	5,0	2,88	5
20 mM Kaliumphosphat	7,0	0,51	5
20 mM Natriumphosphat	7,0	0,61	6
20 mM Natriumhydrogencarbonat	8,0	1,82	6
20 mM Natriumhydrogencarbonat	8,5	0,98	3

Tab. 18: Einfluss des pH-Wertes und des Puffersalzes auf die Lysozymseparation (Wiederfindungsrate des Lysozyms 89,2-105%) ($n=3$)

Die Analyse des Proteingehaltes (siehe Tab. 18) zeigte bei der Verwendung eines sauren Natriumacetatpuffers eine Anreicherung des Lysozym in der PEG-Phase, jedoch nur in rund dreifach höherer Konzentration, was im Vergleich zum rein wässrigen Zweiphasensystem eine deutliche Reduktion der Lysozymmenge in der PEG-Phase bedeutet. Für die Puffersalzsyste mit einem pH-Wert von 7,0 fand man eine vermehrte Anreicherung von Lysozym in der HES-reichen Phase. Dabei machte es keinen Unterschied, ob ein Kalium- oder ein Natriumphosphatpuffer verwendet wurde. Mit ansteigenden pH-Werten und der Verwendung eines Natriumhydrogencarbonatpuffers veränderte sich wiederum die Proteinanreicherung in den beiden Phasen. Es wurde festgestellt, dass sich bei einem pH-Wert von 8,0 mehr Lysozym in der PEG-Phase befindet. Mit einem weiter ansteigenden pH-Wert auf 8,5 verschiebt sich die Lysozymverteilung zugunsten der HES-Phase (Tab. 18).

Ausgehend von diesen Ergebnissen richtete sich der Fokus der Untersuchungen nun auf die Frage, ob die festgestellten Separationsunterschiede hauptsächlich auf die Auswahl des Salzes zurückzuführen waren oder ob es sich tatsächlich um einen pH-Wert-Effekt handelt.

In den Analysen sollte der Einfluß des verwendeten Salzes auf die Proteinseparation geklärt werden. Dazu wurden verschiedene Salzlösungen hergestellt und auf einen pH-Wert von 7,00 eingestellt. Für diese Lösungen wurden unterschiedliche Salzkonzentrationen im Bereich von 20, 50 und 100 mM untersucht. Dabei ist davon auszugehen, dass auch die Salzkonzentration einen erheblichen Effekt auf die Proteinseparation hat. Gleichzeitig sollte mit diesen Experimenten die Suche nach einem geeigneten Puffersystem für die Proteinanreicherung in der Stärkephase weitergeführt werden.

In diesem Zusammenhang wurden Natriumchlorid (NaCl), Kaliumchlorid (KCl), Natriumsulfat (Na_2SO_4), sowie Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) und Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4) analysiert. Der Einfluss des verwendeten Puffersalzes auf die Separation des Lysozyms ist in Abbildung 35 dargestellt. Dabei zeigt sich, dass Salze wie Na_2SO_4 , Na_2HPO_4 und K_2HPO_4 die Anreicherung des Lysozyms in der stärkereichen Phase begünstigen, während Salze wie NaCl und KCl die Lysozymseparation in der PEG-reichen Phase unterstützen. Des Weiteren wird in der Abbildung 35 der Einfluss der Salzkonzentration aufgezeigt. Man kann erkennen, dass mit zunehmender Salzkonzentration von 20 mM auf 50 mM eine verstärkte Umverlagerung des Lysozyms in die PEG-Phase beobachtet werden kann. Mit der Zunahme der Salzkonzentration auf 100 mM zeigen alle Salzverbindungen wiederum eine Abnahme der Proteinkonzentration in der PEG-Phase.

Die verwendeten Salze sind klassische Salze der Hofmeister-Serie. Danach begünstigen Anionen wie die Sulfate und die Phosphate die Hydratation der Proteine und wirken auf das entsprechende Protein stabilisierend. Diese Stabilisierung bzw. Hydratation des Lysozyms hat zur Folge, dass man unter der Verwendung von Phosphaten und Sulfaten das Protein vermehrt in der HES-Phase anreichern kann. Chloride haben nach der Hofmeister-Serie

eher einen destabilisierenden Effekt. Dabei ist zu beobachten, dass der destabilisierende Einfluss der Chloride zu einer Anreicherung des Lysozyms in der PEG-Phase führt. Die durch die dazugehörigen Kationen zu erwartenden Effekte sind eher als gering einzustufen.

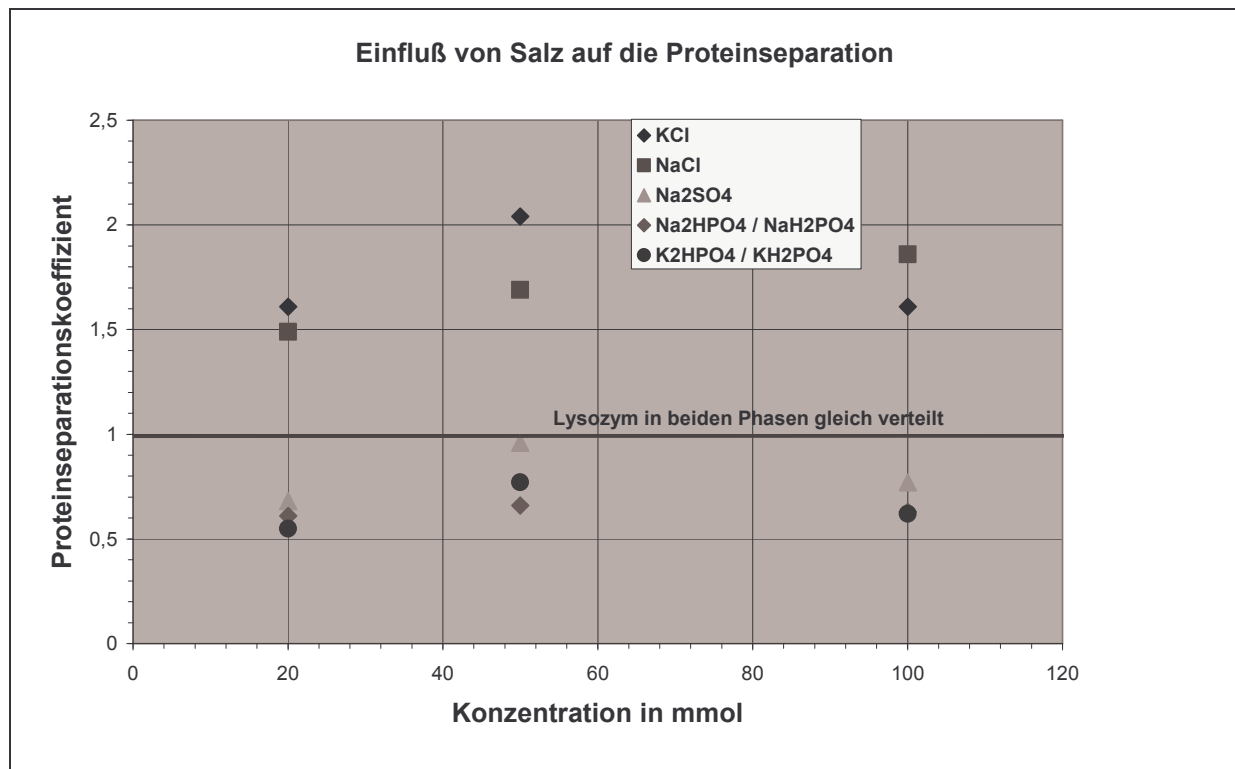


Abb. 35: Einfluss der Art des Puffersalzes und der Salzkonzentration auf die Lysozymseparation

Betrachtet man im Zusammenhang mit den destabilisierenden oder stabilisierenden Effekten der verschiedenen Elektrolyte die Veränderungen durch die steigenden Salzkonzentrationen, so stellt man fest, dass der Einfluss der Salze auf die Proteinseparation konzentrationsabhängig ist.

Green beobachtete ähnliche Kurvenverläufe bei der Untersuchung der Löslichkeit von Carboxyhämoglobin in verschiedenen wässrigen Elektrolytlösungen [33]. Dort zeigten die Kurvenverläufe eine Veränderung der Löslichkeit des Proteins bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen. Mit dem Zusatz des entsprechenden Elektrolyts verbesserte sich zunächst die Löslichkeit des Proteins im Medium, um sich mit weiter steigender Elektrolytkonzentration wieder zu verschlechtern. Dabei zeigten sich unterschiedlich starke Ausprägungen bei der Veränderung der Löslichkeit.

Bezieht man diese Information mit in die Betrachtung der eigenen Ergebnisse ein, so kann man die Kurvenverläufe auch als Veränderung des Lösungsverhaltens interpretieren. So besteht die Möglichkeit, abhängig von der Salzkonzentration in den separierten Phasen, dass man die Veränderungen in der Proteinseparation entweder als eine Verbesserung der Löslichkeit des Proteins in der PEG-Phase betrachtet oder sie als eine Verschlechterung der Löslichkeit in der Stärkephase deutet. Die Interpretation ist abhängig von der Salzkonzentration in den separierten Phasen.

Ausgehend von diesem Ergebnis stellte sich nun die Frage, ob die untersuchten Puffersalze im Zweiphasensystem gleichmäßig separieren oder ob sich die untersuchten Salze zu unterschiedlichen Anteilen in den beiden Phasen des Systems anreichern (siehe Abschnitt 4.1.5). Bei einer gleichmäßigen Salzverteilung kann man die Lysozymseparation als Ausdruck der veränderten Lösungseigenschaften des Proteins in den Einzelphasen betrachten. Bei unterschiedlichen Salzgehalten in den Einzelphasen besteht die Möglichkeit, dass ein so genannter Aussalzeffekt eintritt, dass das Protein also durch das Salz aus der Phase verdrängt wird, während gleichzeitig die Verteilung des Proteins in der anderen Phase durch deren Zusammensetzung gefördert wird.

Betrachtet man die vorangegangenen Ergebnisse unter dem Aspekt der Proteinanreicherung in der HES-Phase, so zeigt sich, dass die bisher beste Lysozymanreicherung durch die Verwendung eines 20 mM Natrium- bzw. Kaliumhydrogenphosphatpuffers oder einer Natriumsulfatlösung erreicht werden konnte.

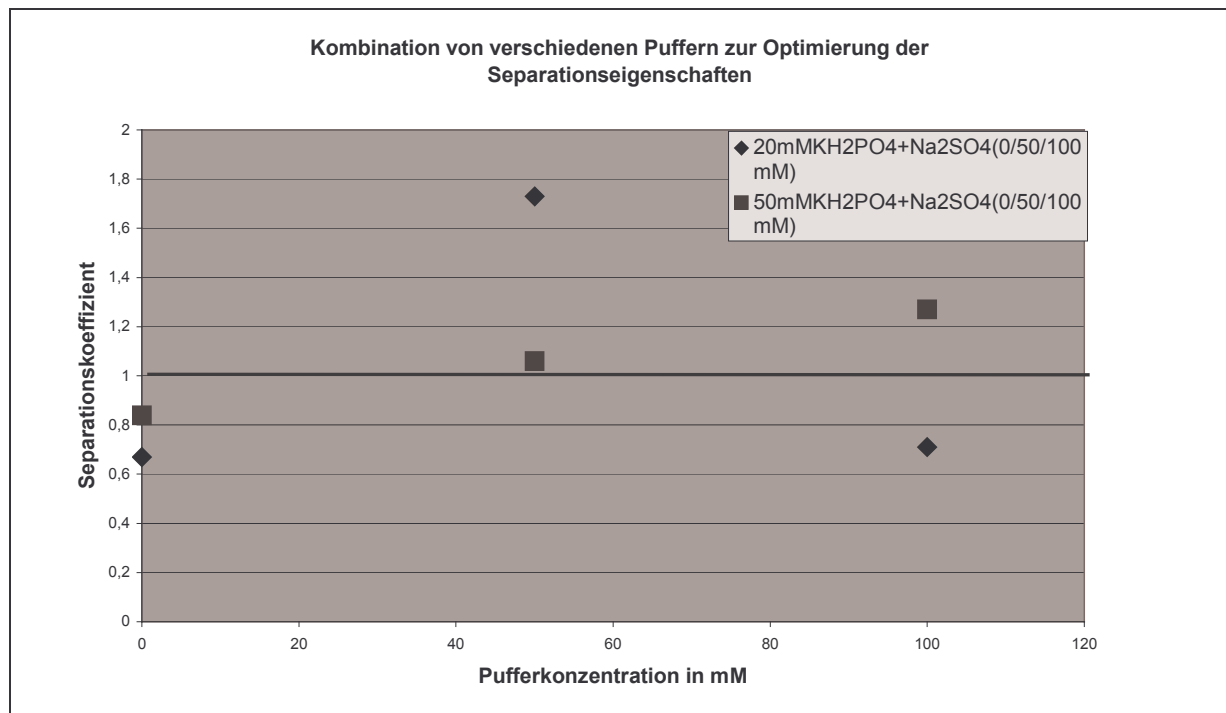


Abb. 36: Einfluss von Salzkombinationen auf die Lysozymseparation im Zweiphasensystem

Ausgehend von diesen Ergebnissen galt es nun zu analysieren, ob eine Kombination dieser Salze die Anreicherung von Lysozym weiter optimieren kann. Dazu wurde eine 20 mM bzw. 50 mM Kaliumhydrogenphosphatlösung mit ansteigenden Konzentrationen an Natriumsulfat im Bereich von 0 mM, 50 mM und 100 mM ergänzt. Man kann in den Ergebnissen wiederum eine Konzentrationsabhängigkeit der Proteinseparation erkennen. Dabei zeigte sich jedoch auch, dass die Mischung von Na₂SO₄ mit K₂HPO₄ zu keiner Verbesserung der Separationseigenschaften von Lysozym führte (siehe Abb. 36).

Zusammenfassend können aus den Untersuchungen zur Phasenseparierung von Lysozym folgende Schlüsse gezogen werden: Um eine Anreicherung des Lysozyms in der HES-

Phase zu begünstigen, sollte ein pH-Wert nahe dem isoelektrischen Punkt des Proteins gewählt werden. Sollte dies aus Stabilitätsgründen nicht sinnvoll sein, besteht die Möglichkeit, den pH-Wert auf 7,0 einzustellen. Der verwendete Puffer sollte nach Möglichkeit entsprechend der Hofmeister-Serie [32] überwiegend stabilisierende Wirkungen auf Proteine zeigen. Die Verwendung von mehreren stabilisierenden Salzen, z.B. Na_2SO_4 und K_2HPO_4 , verbessert die Anreicherung des Proteins in der stärkereichen Phase nicht. Des Weiteren ist darauf zu achten, dass die Konzentration der verwendeten Salze niedrig gehalten wird, also im Bereich von 20 mM. Mit steigender Salzkonzentration erfolgt eine vermehrte Anreicherung von Lysozym in der Polyethylenglykolphase. Dieses Phänomen kann durch einen Aussalzeffekt aus der HES-Phase oder eine salzvermittelte Löslichkeitsverbesserung in der PEG-Phase verursacht werden.

4.1.4.2 Separationsverhalten von Bone-morphogenetic-Protein-2

Basierend auf den Separationsversuchen mit Lysozym wurde untersucht, ob sich die für Lysozym formulierten Ergebnisse auf das Protein Bone-morphogenetic-Protein-2 (BMP-2) übertragen lassen. Für die Untersuchung des Phasenseparationskoeffizienten von BMP-2 wurden 20 mM Salzlösungen eingesetzt. Dabei stellte man einige Systeme auf pH 7,0 ein, welches in diesem Fall nahe am isoelektrischen Punkt des BMP-2 liegt (pI 7,95) und andere auf pH 5,0. Verwendet wurden ein Natriumacetatpuffer, ein Natriumhydrogenphosphatpuffer, sowie eine Kombination aus Natriumhydrogenphosphat und 20 mM Natriumsulfat.

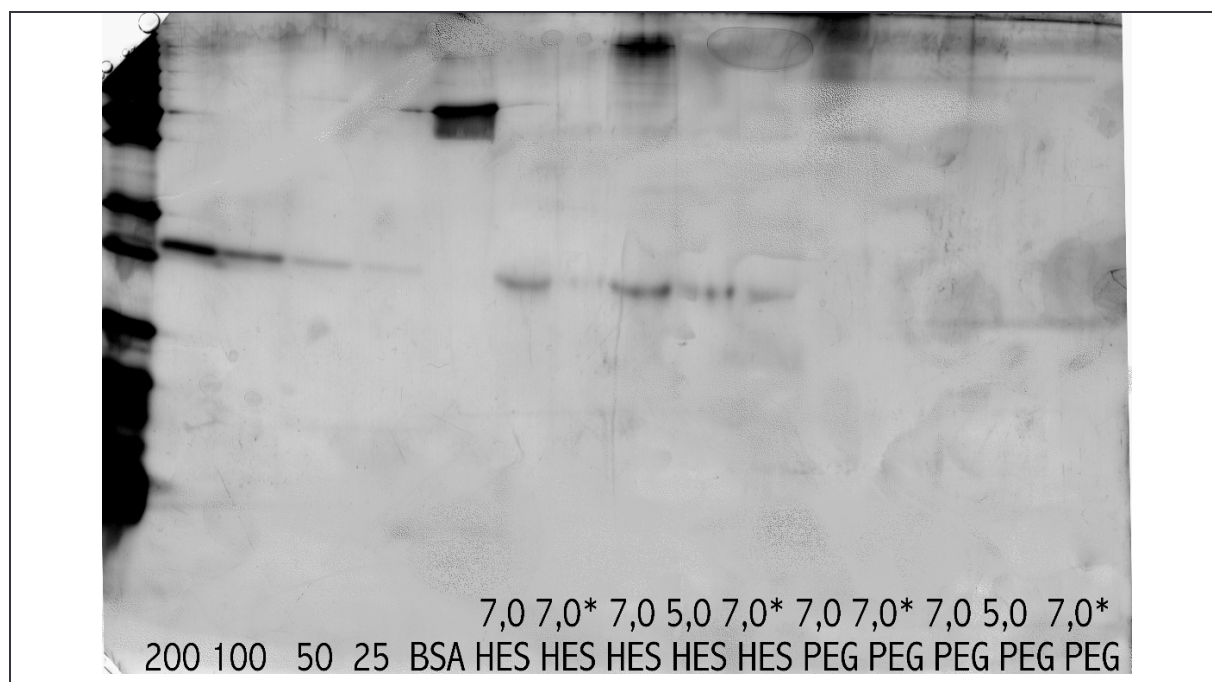


Abb. 37: Elektrophoresegel mit einem halbquantitativen Nachweis BMP-2 in den separierten Einzelphasen

Nach Separierung zeigt sich hier, dass auch bei einem Zweiphasensystem mit BMP-2 als Beladungsprotein die gewünschte Anreicherung des Proteins in der Stärkephase erfolgt,

wenn die für Lysozym postulierten Parameter eingehalten werden, also ein pH-Wert von 7,00 oder in der Nähe des isoelektrischen Punktes des Proteins. Des Weiteren sollten Puffersalze mit stabilisierenden Eigenschaften nach der Hofmeister-Serie ausgewählt werden, was hier durch den Einsatz von Natriumphosphat erfolgte.

Im Unterschied zu den Untersuchungen zum Phasenseparationsverhalten von Lysozym wurde für die Analytik des Phasenseparationsverhaltens von BMP-2 ein halbquantitatives Verfahren zur Bestimmung der Proteinverteilung eingesetzt. Dazu wurden die Phasen des Zweiphasensystems nach der Separation getrennt und eine definierte Probenmenge auf ein Elektrophoresegel aufgetragen. Die Elektrophorese diente der Aufkonzentrierung des Proteins, welches anschließend mit einer Silverstainfärbung detektiert wurde. Parallel zu den Proben wurde auf jedes Gel eine Verdünnungsreihe des BMP- 2 aufgetragen, um Aussagen zu den Konzentrationen von BMP-2 in den Proben machen zu können, sowie ein Proteinmarker und BSA zu Kontrolle der Selektivität der Elektrophorese.

Abbildung 37 zeigt ein solches Elektrophoresegel. Dabei kann man deutlich erkennen, dass in den HES-Phasen BMP-2 in unterschiedlichen Mengen nachweisbar ist und in den PEG-Phasen die Mengen an Protein für einen messbaren Nachweis nicht ausreichen. Betrachtet man die einzelnen Proben im Gel, so handelt es sich bei der Probe 7,0* um Proben mit einem pH-Wert von 7,0 und 20 mM Na_2SO_4 und 20 mM Natriumhydrogenphosphat als Puffersalzsystem. Man kann feststellen, dass für die HES-reichen Proben für diese Salzmischung nur sehr geringe Mengen an BMP-2 im Gel nachweisbar sind. Dagegen zeigen die Proben 7,0 in der HES-Phase eine hohe Konzentration von BMP-2. Hierbei handelt es sich um Zweiphasensysteme mit einem reinen 20 mM Na_2HPO_4 -Puffer ohne weitere Zusätze und einem pH-Wert von 7,0. Des Weiteren wurde ein 20 mM Natriumacetatpuffer mit einem pH-Wert von 5,00 untersucht, bei welchem sich ebenfalls nur geringe Mengen von BMP-2 in der HES- Phase nachweisen lassen.

Über die Verdünnungsreihe der verwendeten BMP-2 Stammlösungen war es möglich, halbquantitativ den Gehalt an BMP-2 in den Einzelphasen zu errechnen. Dies erfolgte, indem die BMP-2 Banden im Gel den entsprechenden Banden der Verdünnungsreihe zugeordnet wurden. Dabei wurde diejenige Konzentration von BMP-2 als Probenkonzentration angegeben, bei der die Stärke und Form der Bandenausprägung der Verdünnungsreihe im Gel am ehesten der Bandenstärke der Probe im Gel entsprach. Anschließend wurden näherungsweise die möglichen BMP-2 Konzentrationen in den separierten Einzelphasen berechnet. In der folgenden Tabelle 19 sind die gemittelten Ergebnisse aus mehreren Versuchsreihen dargestellt.

Puffersystem	Geschätzte BMP-2 Menge HES-Bande im Gel	BMP-2 in der HES-Phase	Gesamtgehalt an BMP-2 pro Probe	Geschätzter Phasenseparationskoeffizient $\frac{C_{PEG-Phase}^{BMP-2}}{C_{HES-phase}^{BMP-2}}$
pH 7,00 20 mM Na ₂ HPO ₄	ca. 100-150 ng	ca. 6,5 – 7,0 µg	7,0 µg	< 0,10
pH 7,00 20 mM Na ₂ HPO ₄	ca. 150-250 ng	ca. 6,5-7 µg	7,0 µg	< 0,07
pH 7,00 20 mM Na ₂ HPO ₄ + 20 mM Na ₂ SO ₄	ca. 25-50 ng	ca. 0,6 – 1,6 µg	3,5 µg	4,2-1,2
pH 5,00 20 mM Naacetat	ca. 50 ng	ca. 2,2 -3,3 µg	7,0 µg	2,2-1,1

Tab. 19: halbquantitative Auswertung der Separation von BMP-2 im HES / PEG Zweiphasensystem

Zur Beurteilung des Phasenseparationskoeffizienten sind einige Abschätzungen über die Verteilung des BMP-2 erforderlich. Wie man den Ergebnissen der Elektrophorese entnehmen kann, reichert sich das Protein BMP-2 überwiegend in der HES-Phase des Zweiphasensystems an. Aus vorangegangenen Untersuchungen (siehe Abschnitt 4.1.4.1) ist bekannt, dass das Phasenvolumenverhältnis zwischen der HES-Phase und der PEG-Phase ca. 1:2 beträgt. Rechnet man nun zurück auf die im Gesamtsystem verteilten BMP-2-Mengen, so zeigt sich, davon ausgehend, dass das Protein zu 100 % im Zweiphasensystem separiert ist und sich nicht an oder in der Phasengrenze befindet, dass die Menge an BMP-2 in der PEG-Phase teilweise gerade unter der Nachweisgrenze von 25 ng liegt.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass sich die Anreicherung des BMP-2 in der HES-Phase nach den gleichen Parametern steuern lässt, wie sie für Lysozym bestimmt wurden. Dabei ermöglichen die untersuchten Einflussfaktoren, wie der pH-Wert, Salzart und dessen Konzentration die Erhöhung der Proteinkonzentration jedoch nicht in dem Maße, dass Proteinverluste komplett verhindert werden können. Die Ergebnisse unserer Testreihen zeigen deutlich, dass sich ein Teil des Proteins immer über das Gesamtsystem verteilt.

4.1.5 Einfluss von Salzen auf das wässrige Zweiphasensystem

In den erfolgten Untersuchungen zur Charakterisierung des wässrigen Zweiphasensystems aus HES und PEG und im Zusammenhang mit den Ergebnissen zur Proteinseparation wurde festgestellt, dass die Möglichkeit besteht, dass sich die verwendeten Salze unterschiedlich zwischen den beiden Phasen verteilen könnten. Aus diesem Grund ergab sich die Fragestellung, inwieweit sich Salze homogen oder heterogen im Zweiphasensystem aus HES und PEG verteilen und ob sich aus diesen Versuchsreihen weitere Aussagen für

das Proteinseparationsverhalten und die Separationseigenschaften des Zweiphasensystems treffen lassen.

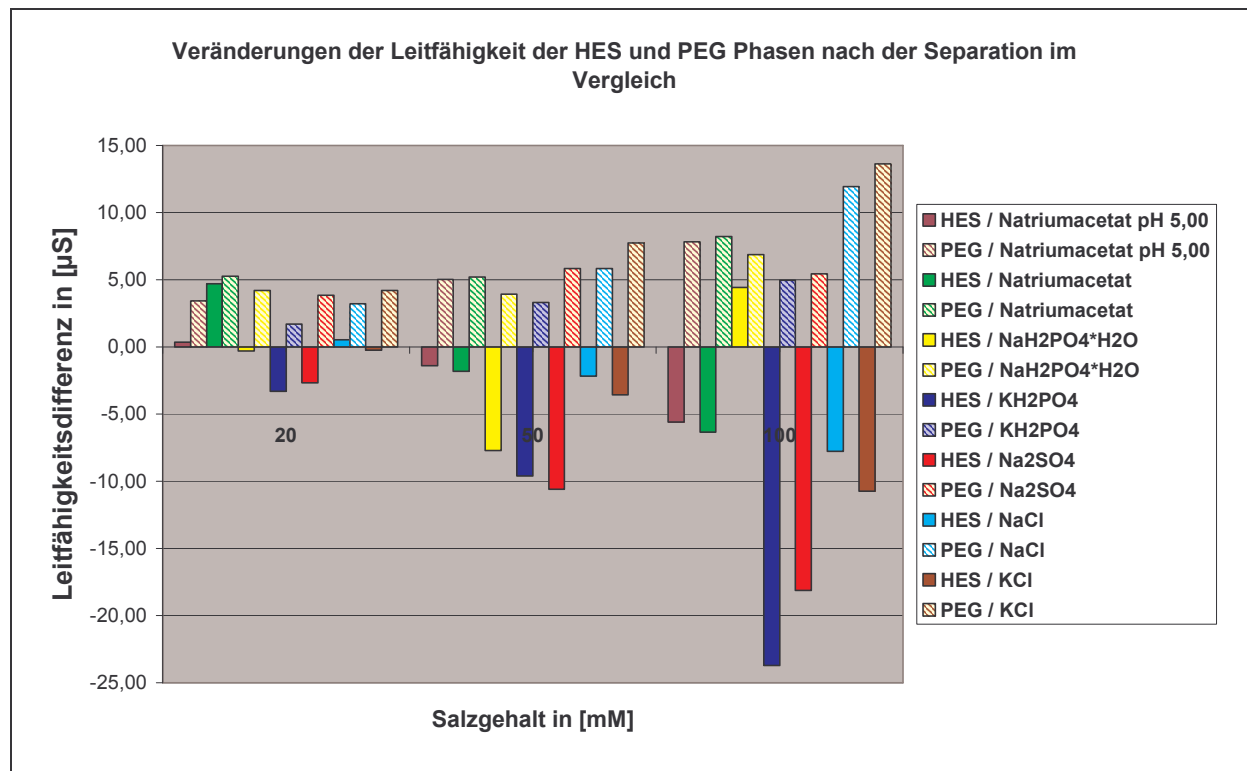


Abb. 38: Veränderung der Leitfähigkeit der HES und PEG-Phase nach Bildung eines Zweiphasensystems

Es wurden Messungen der Leitfähigkeit und Dichte, sowie Viskositätsuntersuchungen durchgeführt und die Ergebnisse, gekoppelt mit Resultaten aus den Charakterisierungsuntersuchungen für das Zweiphasensystem (siehe Abschnitt 4.1.2.), ausgewertet und interpretiert.

In Abbildung 38 sind die messbaren Veränderungen der Leitfähigkeit von verschiedenen salzhaltigen Zweiphasensystemen aus HES 200.000 und PEG 12.000 nach Mischung und Separation dargestellt. Die Separationseigenschaften der Puffersalze wurden über einen Bereich von 20mM, 50mM und 100 mM Salzgehalt beobachtet.

Aus den Ergebnissen in der Abbildung 38 lässt sich ablesen, dass für alle PEG-reichen Phasen nach dem Separationsprozess eine Zunahme der Leitfähigkeit bestimmt werden kann. Gleichzeitig nahm die Leitfähigkeit in den HES-reichen Phasen ab. Daraus kann geschlossen werden, dass sich die Salze im Zweiphasensystem auf unterschiedliche Weise in den beiden gebildeten Phasen anreichern können, welches vermehrt in der PEG-reichen Phase erfolgt. In den vorangegangenen Betrachtungen ist davon ausgegangen worden, dass es möglich ist, dass die beiden verwendeten Polymere unterschiedliche Wasserstrukturierungen begünstigen. Kommt es zur Bildung von unterschiedlichen Wasserstrukturierungen, so ist davon auszugehen, dass die Salze sich so in den beiden Phasen anreichern, dass die vorherrschende Strukturierung begünstigt wird. Im

Zusammenhang mit der heterogenen Verteilung der Salze im Zweiphasensystem stellte sich die Frage, ob es neben der Salzumverteilung auch zu einer Wasserverteilung durch die Verwendung von Elektrolytlösungen kommt.

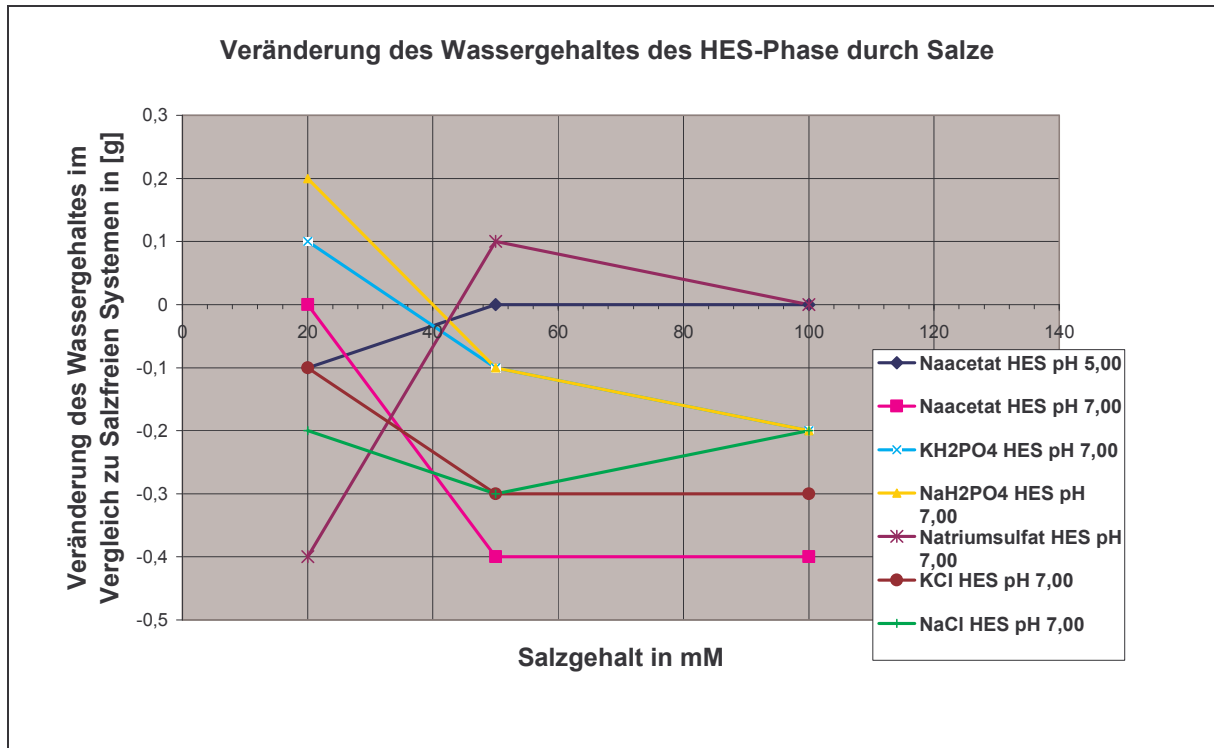


Abb. 39: Veränderung des Wassergehaltes in der HES- Phase durch die Verwendung von Puffersalzen im Vergleich zum salzfreien Zweiphasensystem

Aus diesem Grunde wurde untersucht, ob durch die Salzverlagerung auch das Wasser zwischen den beiden Phasen in gleichen Maß umverteilt wird wie das Salz. Die erhaltenen Ergebnisse wurden verglichen mit salzfreien Systemen. Aus vorangegangenen Untersuchungen ist bereits bekannt, dass der Wassergehalt der PEG-Phase eines salzfreien Zweiphasensystems immer wesentlich höher ist als in der HES-Phase und dass mit zunehmendem Wassergehalt hauptsächlich der Wassergehalt der PEG-Phase ansteigt. Es wurde festgestellt, dass die HES-Phase in Abhängigkeit von der HES-Konzentration nur eine definierte Menge an Wasser aufnehmen kann.

Die gemessenen Veränderungen des Wassergehaltes in der HES-Phase durch die Verwendung von Elektrolytlösungen sind in der Abbildung 39 dargestellt. Dabei wurde neben dem Einfluss des Salzes selbst auch der Einfluss einer steigenden Salzkonzentration ermittelt. Es ist deutlich erkennbar, dass mit zunehmender Salzkonzentration im Zweiphasensystem der Wassergehalt in der HES-Phase für die meisten verwendeten Salze abnimmt. Differenziert man die Betrachtung, so zeigt sich bei einem Salzgehalt von 20 mM, dass mit Kalium- und Natriumhydrogenphosphat versetzte Zweiphasensysteme einen höheren Anteil an Wasser in der HES-Phase zeigen im Vergleich zu salzfreien Systemen. Dagegen weisen alle anderen Puffersalzsysteme einen unveränderten oder geringeren Wassergehalt in der HES-Phase als salzfreie Systeme auf. Mit steigendem Salzgehalt ist, bis

auf zwei Ausnahmen, für alle betrachten puffersalzhaltigen Zweiphasensysteme eine Abnahme des Wassergehaltes in der HES-Phase festzustellen. Ein Sonderfall ist Natriumsulfat, das zunächst eine Zunahme des Wassergehaltes verursacht, der jedoch bei einer Konzentration von 100 mM wieder auf den ursprünglichen Wasserwert des salzfreien Systems absinkt. Eine weitere Ausnahme bildet das Zweiphasensystem mit Natriumacetat pH 5,0. Hier kommt es ebenfalls zu einem Anstieg im Wassergehalt, welcher dann jedoch mit Zunahme der Salzkonzentration konstant bleibt.

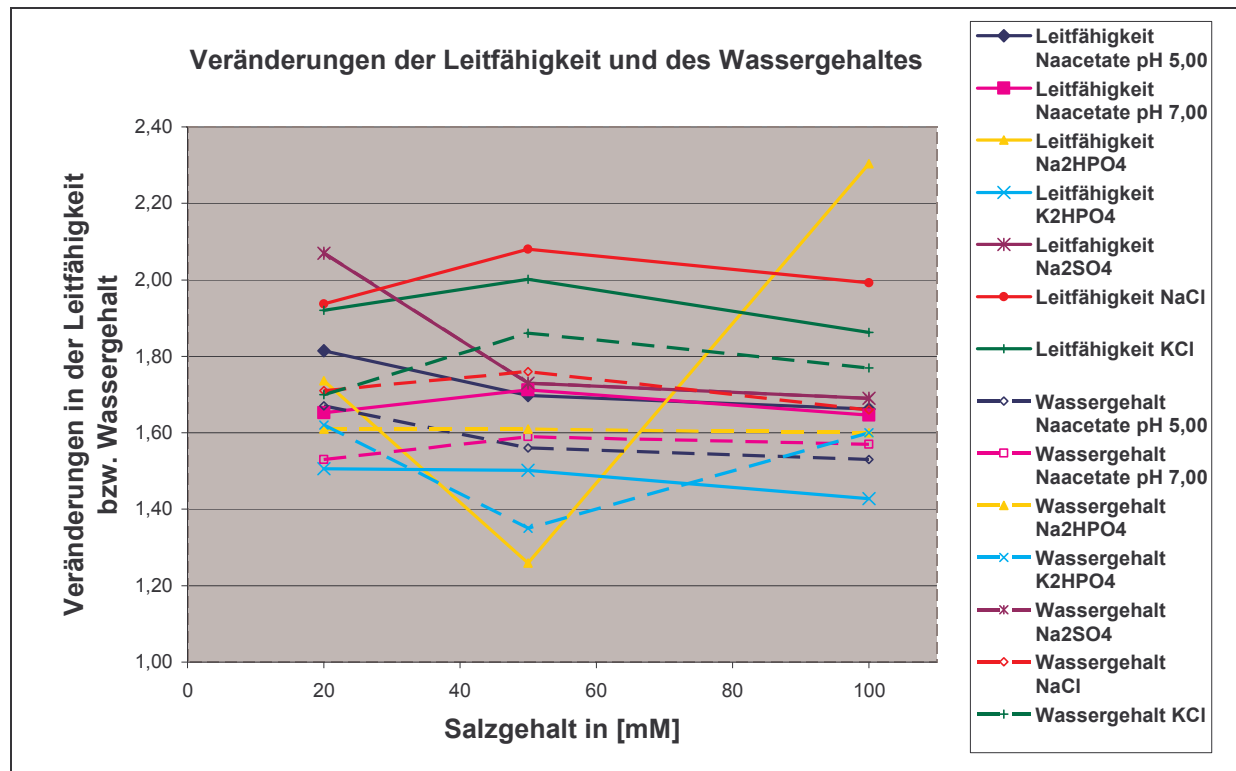


Abb. 40: Veränderung des Wassergehaltes und des Salzgehaltes in der PEG-Phase

Um die Veränderungen der Leitfähigkeit und des Wassergehaltes besser im Zusammenhang sehen zu können, wurden für die PEG-Phase beide Datensätze in einem Diagramm in Abbildung 40 dargestellt. Gleichzeitig wird auch der Einfluss der Salzkonzentration gezeigt. Betrachtet man das Ausmaß der Wasserverteilung im Vergleich zur Veränderung der Leitfähigkeit, so korrelieren die Werte nicht direkt miteinander, d.h. es wird nicht genauso viel Wasser wie Salz umverteilt.

Man kann in der Abbildung 40 erkennen, dass Salze wie Natriumchlorid (NaCl) und Kaliumchlorid (KCl), sowie Natriumacetat bei pH 5,00 und 7,00 parallele Kurvenverläufe mit zunehmender Salzkonzentration beim Vergleich der Leitfähigkeits- und der Wassergehaltsveränderungen in der PEG-Phase zeigen.

Dabei kann für Natriumacetat pH 5,00 mit steigender Salzkonzentration sowohl für den Wassergehalt als auch für die Leitfähigkeitsveränderungen festgestellt werden, dass beide Werte abnehmen. Das bedeutet, dass sich der Wassergehalt in ähnlichem Maße reduziert, wie die Leitfähigkeit abnimmt. Für Natriumacetat pH 7,0 zeigen die Kurvenverläufe an, dass

der Wassergehalt und die Leitfähigkeit mit zunehmender Salzkonzentration auf 50 mM leicht zunehmen, um anschließend bei einer Konzentration von 100 mM auf die Ausgangswerte wie bei 20 mM abzusinken. Ein ähnliches Bild ergibt sich für NaCl und KCl mit steigenden Salzkonzentrationen.

Für Na_2SO_4 ist ein deckungsgleicher Verlauf beider Kurven festzustellen, d.h. die Veränderungen in der Leitfähigkeit entsprechen genau den Mengenveränderungen im Wassergehalt mit steigender Salzkonzentration.

Nur Kalium- und Natriumhydrogenphosphat weisen sehr gegensätzliches Verhalten bei der Wasseranreicherung und den Veränderungen in der Leitfähigkeit auf. Hier bleibt der Wassergehalt relativ konstant für Na_2HPO_4 , während die Leitfähigkeit in der PEG-Phase mit zunehmendem Salzgehalt sehr stark variiert. Bei der Veränderung der Salzkonzentration von 20 mM auf 50 mM kommt es zu einem deutlichen Abfall des Wassergehaltes in der PEG-Phase und beim Anstieg auf 100 mM zu einer deutlichen Erhöhung des Wassergehaltes. Für K_2HPO_4 zeigt die Leitfähigkeit für alle Konzentrationen einen konstant abnehmenden Verlauf, während der Wassergehalt von 20 mM zu 50 mM Salzgehalt erst abnimmt, um dann bei 100 mM wieder stark zuzunehmen.

Versucht man diese unterschiedlichen Effekte durch den Einsatz der verschiedenen Salze zu erklären kann man sich verschiedener Betrachtungsweisen annehmen. Man kann das Zweiphasensystem aus PEG und HES als Mischung von gelösten und separierten Stoffen in Wasser betrachten. Dabei bildet Wasser den größten Mengenanteil in diesem System. Aus diesem Grund sind zur Erklärung dieser Ergebnisse die besonderen Eigenschaften von Wasser zu berücksichtigen (siehe Abschnitt 2.1.1). Es ist bekannt, dass Wasser in der Lage ist, unterschiedliche Strukturierungen bzw. Cluster zu bilden [22, 24, 87]. Dabei postulieren neuere Theorien über das Wasser zum einen eine geöffnete Clusterstruktur mit niedriger Dichte, welche zum anderen im Gleichgewicht steht mit einer geschlossenen oder kondensierten Wasserclusterstruktur mit hoher Dichte. Es ist bekannt, dass Salze die Ausbildung der Clusterstrukturen des Wassers unterschiedlich stark begünstigen bzw. verhindern. Es gibt Strukturbrecher, welche die Bildung der geöffneten Clusterstruktur geringer Dichte begünstigen können und Strukturbildner, welche die Bildung der dichteren geschlossenen Wassercluster begünstigen [24].

Bei der Annahme, dass die verwendeten Polymere ebenso wie die Salze aufgrund ihrer funktionellen Gruppen durch entsprechende Wechselwirkungen die Clusterstruktur des Wassers beeinflussen, besteht die Möglichkeit, dass sich in beiden Phasen eines wässrigen Zweiphasensystems unterschiedliche Wasserstrukturierungen ausbilden. Setzt man dem Zweiphasensystem unter diesem Aspekt Salze zu, so ist es möglich, dass die eingesetzten Salze entsprechend ihrer stabilisierenden oder destabilisierenden Eigenschaften auf die Wassercluster sich in der Phase anreichern würden, die sie energetisch stabilisieren können.

Im Bezug auf das wässrige Zweiphasensystem aus HES und PEG ist bekannt, dass die Polyethylenglycole strukturbrechende Eigenschaften auf Wasser haben und damit die Bildung von weniger dichtem Wasser begünstigen. Bei Untersuchungen der Dichten der beiden separierten Phasen ist festzustellen, dass die obere PEG-reiche Phase eine Dichte von $0,996 \text{ g/cm}^3$ für Lösungen mit einer Konzentration von 1 mg / ml aufweisen und für die untere HES-Phase von $1,0014 \text{ g/cm}^3$. Die Dichteunterschiede zwischen den beiden Phasen können einen Hinweis darauf liefern, dass sich in den separierten Phasen unterschiedliche Wasserstrukturierungen ausgebildet haben. Um sich dieser Betrachtung weiter zu nähern, erfolgte die Untersuchung der Viskosität. Es ist bekannt, dass sich die Viskosität des Wassers durch die Anwesenheit von strukturbildenden Substanzen erhöht und durch Strukturbrecher erniedrigt.

Aus diesem Grund wurde untersucht, ob sich Unterschiede in der Viskosität zwischen HES und PEG-Phase nachweisen lassen und ob ein festgestellter Effekt sich durch den Zusatz von Puffersalzlösungen weiter verändert.

In den Viskositätsuntersuchungen wurde festgestellt, dass die ermittelte komplexe Viskosität der PEG-Phase von $0,0131$ wesentlich geringer ist, als die der HES-Phase von $0,0935$ (siehe Abb. 41, 42). Dabei spiegeln die Ergebnisse zu den Viskositätsuntersuchungen die Resultate der Dichtebestimmung wieder. Betrachtet man die Veränderungen in der komplexen Viskosität durch den Zusatz von Salzen zum HES-PEG-Zweiphasensystem so ist zu erkennen, dass die Verwendung von Puffersalzen die Viskosität der HES-Phase stärker beeinflusst, als die der PEG-Phase.

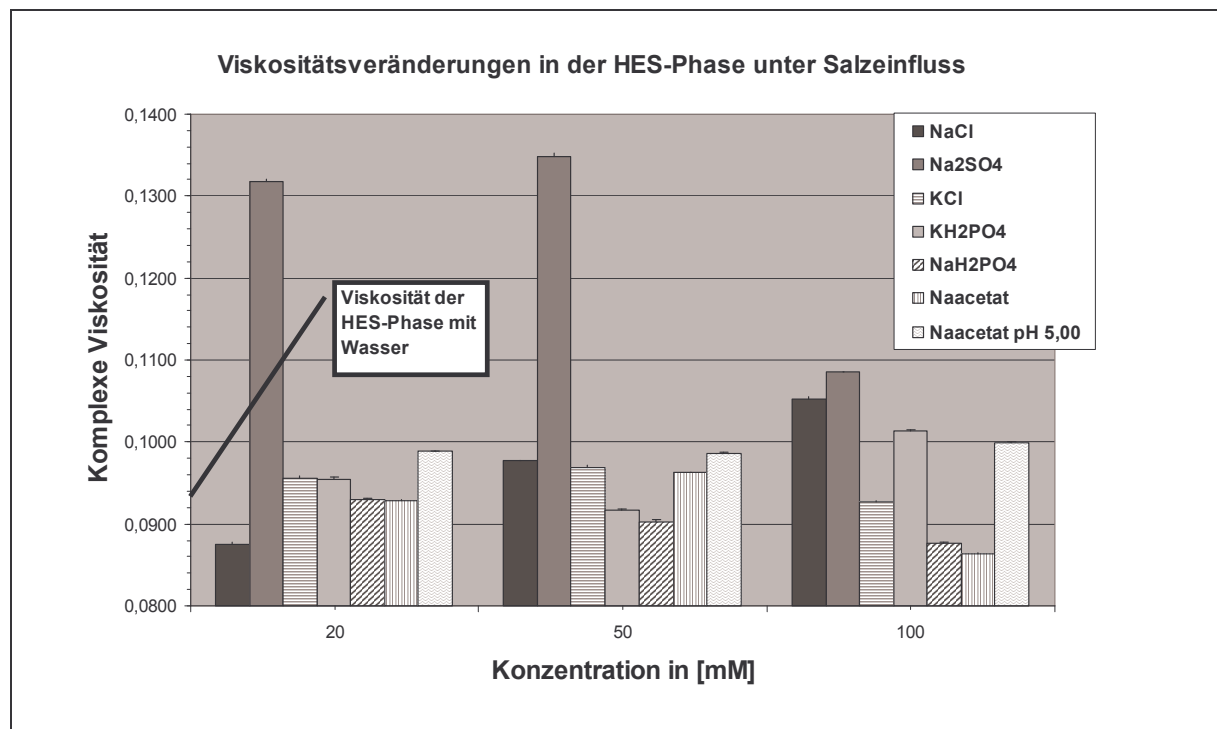


Abb. 41: Viskositätsveränderung der HES- Phase im Zweiphasensystem durch die Verwendung von Puffersalzen ($n=10$)

Wie in Abbildung 41 dargestellt, zeigt die HES-Phase je nach eingesetztem Puffersalz und dessen Konzentration unterschiedliche Effekte. Es kommt zum einen durch bestimmte Salze, wie Natriumhydrogenphosphat, zur kontinuierlichen Reduktion der Viskosität der HES-Phase mit steigender Salzkonzentration und durch andere wie Natriumsulfat zur Erhöhung der Viskosität. Deutlich wird der Anstieg der Viskosität bei der Verwendung von Natriumsulfat. Dabei steigt die Viskosität mit zunehmender Salzkonzentration erst an und reduziert sich dann wieder. Bei Salzen wie NaCl und Natriumacetat pH 5,00 zeigt sich überhaupt keine Veränderung in der Viskosität der HES-Phase.

Vergleicht man die Ergebnisse aus Abbildung 41 und 42 für die Viskositätsbestimmung der HES- und der PEG-Phasen, so ist festzustellen, dass in der HES-Phase deutliche Veränderungen der Viskosität ermittelbar waren. Die PEG-Phase zeigt hingegen nur einen Anstieg in der Viskosität bei der Verwendung von Natriumsulfat. Alle anderen Messwerte liegen im Bereich der Viskosität einer reinen wasserhaltigen PEG-Phase eines wässrigen Zweiphasensystems.

Berücksichtigt man bei der Betrachtung der Abbildung 42, dass es sich bei Polyethylenglycol um eine strukturbrechende Substanz handelt, so erklärt sich die niedrige Viskosität der PEG-Phase. Gleichzeitig zeigt die Grafik, dass die Strukturierung dieser Phase so verändert ist, dass durch den Zusatz von Salzen keine weitere Reduktion der Viskosität erfolgen kann.

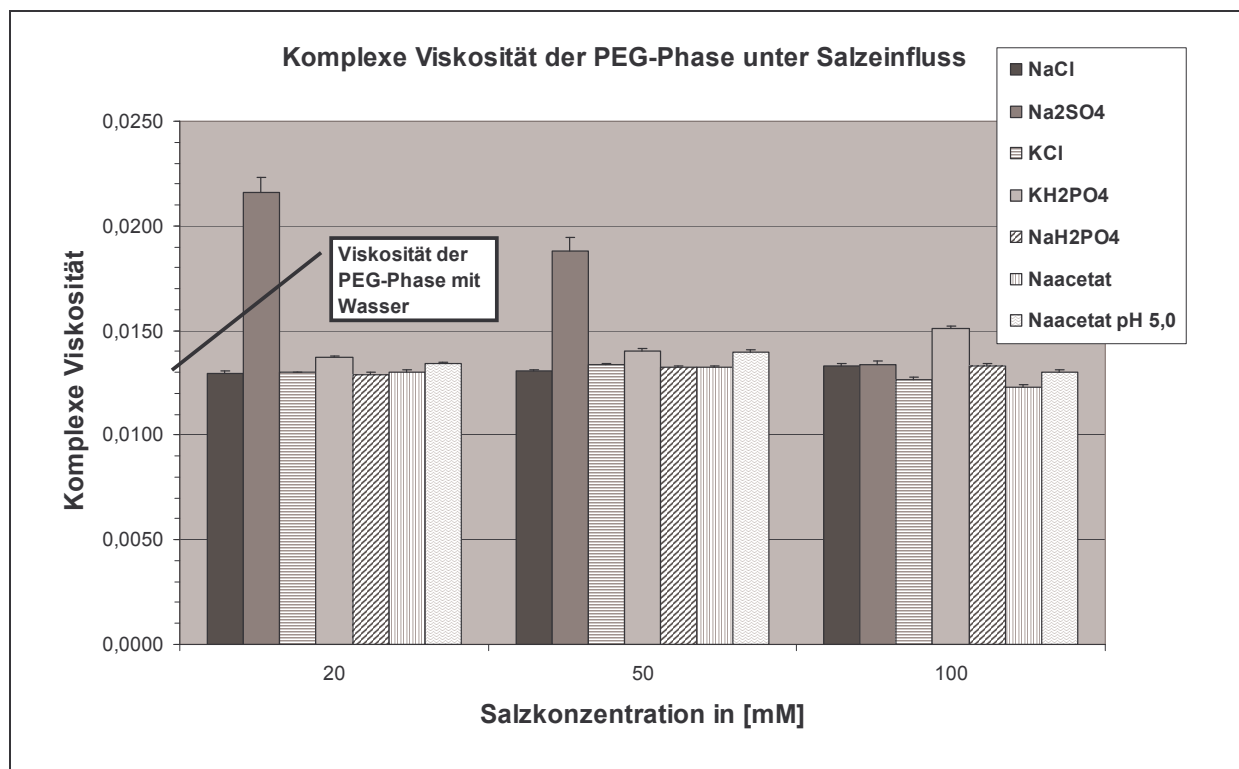


Abb. 42: Veränderung der komplexen Viskosität der PEG-Phase unter Salzeinfluss ($n=10$)

Betrachtet man die Veränderungen der Viskosität im Zusammenhang mit den Ergebnissen zur Salzanreicherung und zur Wasserverteilung im Zweiphasensystem, so ergibt sich für Na₂SO₄ folgendes Bild: Im Zweiphasensystem nimmt die Leitfähigkeit der HES-Phase nach

der Separation mit steigender Na_2SO_4 -Konzentration kontinuierlich ab. Es wurde daraus geschlossen, dass es zu einer Umverteilung des Salzes zwischen den beiden separierenden Phasen kommt. Nach diesem Ergebnis stand die Frage, ob sich das Wasser ebenfalls unterschiedlich verteilt. Für Na_2SO_4 wurde festgestellt, dass die Wasserkonzentration in der HES-Phase mit dem Salzzusatz erst niedriger ist als im salzfreien System und mit steigender Na_2SO_4 -Konzentration zunimmt. So ist davon auszugehen, dass es durch den Zusatz von Na_2SO_4 zur Umverteilung von Salz und Wasser kommt. Dabei ist zu berücksichtigen, dass sich ein gewisser Anteil an Salz und Wasser weiterhin in der HES-Phase befindet. Die ermittelte erhöhte Viskosität der HES-haltigen Phase kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen wird die Viskosität der HES-Phase beeinflusst durch die Abwanderung von Wasser aus dieser Phase und einer daraus resultierenden Erhöhung der Polymerkonzentration. Zum anderen kann sich die Viskosität der HES-Phase erhöhen durch die strukturbildenden Eigenschaften von Na_2SO_4 auf das Wasser. Dabei wird die Viskositätserhöhung durch die strukturbildenden Eigenschaften des Na_2SO_4 gestützt durch die Untersuchungen der PEG-Phase, in der man trotz der Zunahme des Wassergehaltes und des Salzgehaltes eine Viskositätserhöhung beobachten konnte. Es wird dabei davon ausgegangen, dass beide Effekte zur Viskositätserhöhung beitragen.

Nun stellt sich die Frage, warum mit zunehmender Salzkonzentration kein weiterer Anstieg der Viskosität zu verzeichnen ist. Dazu sind die Daten zur Wasseranreicherung für natriumsulfathaltige Zweiphasensysteme zu berücksichtigen, denn mit zunehmender Salzkonzentration nimmt auch die Wasseranreicherung in der HES-Phase zu. Es ist davon auszugehen, dass der Verdünnungseffekt durch das Wasser die Viskosität der HES-Phase reduziert.

Substanzen wie Na_2HPO_4 und K_2HPO_4 zeigen in Abbildung 42 für die PEG-Phase keinen Einfluss auf die Viskosität. Betrachtet man dazu die durch die beiden Salze beeinflussten Veränderungen in der Leitfähigkeit und im Wassergehalt, so kann man feststellen, dass mit steigender Salzkonzentration der Wassergehalt in der PEG-Phase zunimmt. Bei den Veränderungen des Salzgehaltes stellt man Unterschiede zwischen Na_2HPO_4 und K_2HPO_4 fest. So zeigt Na_2HPO_4 mit zunehmender Salzkonzentration eine Abnahme des Salzgehaltes in der PEG-Phase und K_2HPO_4 eine Zunahme. Aufgrund dieser Ergebnisse würde man davon ausgehen, dass die Viskosität der HES-Phase zunimmt, was jedoch nicht der Fall ist. Stattdessen ist zu beobachten, dass die Viskosität für Na_2HPO_4 -haltige Systeme abnimmt und für K_2HPO_4 -haltige Systeme zunimmt. Dieses Phänomen ist zu erklären durch salzinduzierte Störungen der HES-Phasenstrukturierung. Kommt es durch ein Salz wie K_2HPO_4 zur Störung der Strukturierung der HES-Phase bzw. der Wasserstruktur der HES-Phase so nimmt die Viskosität dieser Phase ab, obwohl es aufgrund des Wasserverlustes

theoretisch zu einer Viskositätszunahme kommen sollte. Verlässt dieses Salz die entsprechende Phase, so erklärt sich die Zunahme der Viskosität.

Betrachtet man auf diese Weise alle verwendeten Salze, so ist festzustellen, dass für jedes einzelne salzhaltige wässrige Zweiphasensystem aus HES-PEG die verschiedenen Größen, wie die Wasserverteilung und die Salzverteilung erheblichen Einfluss haben auf die effektive Polymer-Salzkonzentration in den Einzelphasen und damit sowohl die Viskosität als auch die Dichte beeinflussen. Für die Erklärung aller auftretenden Phänomene müssen aber in jedem Fall die Beeinflussung der Wasserstrukturierung und die mögliche Veränderung der Polymerstruktur berücksichtigt werden.

4.1.6 Zusammenfassung der Charakterisierung wässriger Zweiphasensysteme unter Berücksichtigung des Phasenseparationsverhaltens von Proteinen

In den Untersuchungen zur Charakterisierung wässriger Zweiphasensysteme aus HES und PEG wurde festgestellt, dass die Bildung einer zweiphasigen Mischung beeinflusst wird durch den Substitutionsgrad der HES und durch das Molekulargewicht des PEGs. Dies bedeutet, dass je niedriger der Substitutionsgrad der HES und je höher das Molekulargewicht von PEG ist, desto geringere Polymerkonzentrationen notwendig sind für die Bildung einer zweiphasigen Mischung. Es zeigte sich in den Untersuchungen, dass die Molekülgröße der HES zwischen 130.000 und 450.000 keinen Einfluss auf die Lage der Binodalkurven hat. Eine Begründung für diese Ergebnisse findet sich bei der Betrachtung der Ursachen für die Zweiphasenbildung. Dabei wird davon ausgegangen, dass es zur Phasenseparation kommt durch Wechselwirkungen zwischen den Polymeren. Durch die Erhöhung des Substitutionsgrades der HES wird die HES weniger hydrophil und die abstoßenden Wechselwirkungen mit PEG reduzieren sich. Nimmt die Molekülgröße von PEG zu, reduzieren sich die hydrophilen Eigenschaften des Moleküls und es kann zu mehr Interaktionen mit der hydrophileren HES-Oberfläche kommen und das System separiert schneller. Der Einfluss des Substitutionsgrads von HES auf die Wechselwirkungen zwischen den beiden Polymeren zeigt sich auch bei der Analyse der Phasenseparationszeit. Mit höherem Substitutionsgrad vergrößern sich die Zeitkonstanten der Phasenseparation. Parallel dazu konnte gezeigt werden, dass die Lage der Mischung im Zweiphasensystem einen erheblichen Einfluss auf die Phasenseparationszeit hat. Je näher sich die Mischung an der Binodalkurve befindet, desto länger wird die Separationszeit.

Für zweiphasige Mischungen aus HES und PEG wurde in Untersuchungen zur Phasenmengenverteilung festgestellt, dass die sich bildenden Phasen nahezu gleich groß sind. Dabei zeigte sich, dass die HES-Phase immer eine von ihrer vorliegenden Konzentration abhängige Menge Wasser aufnimmt. Ist mehr Wasser vorhanden als die HES-

Phase benötigt, so verteilt sich diese in die PEG-Phase. Dabei weist die PEG-Phase eine höhere Molarität als die HES-Phase auf.

Im Rahmen der Charakterisierung des Zweiphasensystems wurden die Lösungsstrukturen der verwendeten Polymere in Wasser untersucht. Mit Hilfe der Lösungsstrukturen sollten Rückschlüsse auf die möglichen Wechselwirkungen zwischen den Polymeren gezogen werden, da die Möglichkeit der stabilisierenden oder destabilisierenden Interaktionen zwischen PEG und HES hauptsächlich über deren Oberfläche erfolgen kann. Dabei wurde für PEG die Struktur eines teilgestreckten Polymerknäuels ermittelt und für HES die Form eines halbflexiblen Stäbchens. Dabei ist davon auszugehen, dass sich bei jeder möglichen Faltungsform von HES an der Oberfläche des halbflexiblen Stäbchens hydrophile Gruppen befinden, während sich beim PEG in Form von teilgestreckten Knäueln sicherlich ein größerer Anteil an hydrophoben Strukturbereichen an der Moleküloberfläche befinden. Trifft nun HES auf PEG, ist schon aufgrund der jeweiligen Lösungsstruktur und den durch die Oberfläche beeinflussten hydrophil- hydrophoben- Wechselwirkungsmöglichkeiten eine erhöhte Separierungstendenz zu erwarten.

Des Weiteren wurde für das Zweiphasensystem aus HES und PEG untersucht, welchen Einfluss der Zusatz von Salzen und Proteinen hat und inwieweit sich das System durch diese Stoffe verändert. Dabei sollten die Untersuchungen auch dazu dienen, Steuerungsmöglichkeiten für eine Anreicherung von Protein in einer der HES-Phase zu finden. Für das untersuchte Protein Lysozym wurde festgestellt, dass es sich ohne Salzzusätze überwiegend in der PEG-Phase des Zweiphasensystems anreichert. Will man die Konzentration an Lysozym in der HES-Phase erhöhen, so ist dies möglich über den Zusatz von Salzen. Dafür eignen sich Salze mit stabilisierenden Eigenschaften entsprechend der Hofmeisterserie wie Na_2SO_4 und K_2HPO_4 bzw. Na_2PO_4 bei einem neutralen pH-Wert. Diese Ergebnisse konnten mit Hilfe eines zweiten Proteins, dem BMP-2, bestätigt werden. In weiteren Analysen konnte gezeigt werden, dass Salzzusätze das Zweiphasensystem erheblich verändern. So separieren zugesetzte Salze ähnlich wie die untersuchten Proteine unterschiedlich in den beiden sich bildenden Phasen. Dabei kommt es neben der heterogen Salzverteilung auch zu einer Umverteilung des Wassergehaltes, welches sowohl die Viskosität der Phasen als auch die Dichte beeinflusst. Dabei zeigte sich auch, dass die ermittelten Viskositätsveränderungen durch den Zusatz von Salzen nicht allein durch die Wasser- und Salzumverteilungen erklärbar sind, sondern auch Zusammenhänge mit der begünstigten Wasserstrukturierung zeigen.

Will man komplexe Systeme aus Wasser, Polymeren, Salz und Proteinen näher beschreiben, so ist neben der Betrachtung der Interaktionsmöglichkeiten zwischen den verwendeten Makromolekülen unabdingbar, dass auch die verschiedenen Wasserstrukturierungen in die Betrachtungen mit einbezogen werden.

4.2 Synthese und Charakterisierung einer polymerisierbaren Hydroxyethylstärke

Für die Herstellung von Mikropartikeln war es notwendig, die im wässrigen Zweiphasensystem verwendete Hydroxyethylstärke mit einer polymerisierbaren Verbindung zu verknüpfen. Dazu wurde eine polymerisierbare Verbindung gesucht, welche eine gute biologische Verträglichkeit bzw. physiologische Unbedenklichkeit aufweist, ohne den Hydrogelcharakter der im Zweiphasensystem verwendeten Hydroxyethylstärke zu stark zu beeinflussen. Dies bedeutet, es sollte sich um eine kleine Verbindung handeln, welche in der Lage ist, die großen Ketten der Hydroxyethylstärke durch kleinere Brücken zu verbinden. Untersucht wurde in diesem Zusammenhang Hydroxyethylmethacrylat (HEMA). Die Auswahl dieses Monomers für die Erzeugung einer polymerisierbaren Verbindung mit der Hydroxyethylstärke erfolgte aufgrund der günstigen Datenlage über die Verträglichkeit und den Abbau von HEMA. So zeigen Studien zur Toxikologie von HEMA- Monomeren, dass der Stoff sehr schnell über den Gastrointestinaltrakt in den Körper aufgenommen wird und sich dort zügig verteilt. Die aufgenommenen Mengen an HEMA-Monomer werden größtenteils als CO₂ über die Lungen abgeatmet bzw. über den Harn ausgeschieden, wobei die aufgenommene Menge an HEMA an einem Tag vollständig eliminiert wird. Im Tierexperiment zeigte die Konzentration von 0,02 mmol HEMA-Monomer pro Kilogramm Körpergewicht keine zytotoxischen Effekte [88]. Daneben zeigten Testreihen an männlichen Albinoratten mit implantierten Dextran–HEMA–Hydrogelnetzwerken keine Abstoßungsreaktionen des untersuchten Materials [3]. Jedoch ging aus den Untersuchungen auch hervor, dass die Verträglichkeit der Polymermikropartikel vom Wassergehalt des gebildeten Hydrogels abhängig ist [89].

4.2.1 Entwicklung eines polymerisierbaren Hydroxyethylstärkederivates

In diesem Abschnitt wird die Umsetzung der zuvor analysierten und charakterisierten Hydroxyethylstärke Mw 200.000, DS 0,5 mit definierten Mengen einer Hydroxyethylmethacrylatfunktion (HEMA) beschrieben. Dabei diente die Untersuchung dazu, eine polymerisierbare HES-Verbindung zu schaffen. Angewandt wurde eine von van-Dijk-Wolthuis [13] entwickelte Methode, um ein hydroxyethylmethacrylathaltiges polymerisierbares HES-Derivat herzustellen.

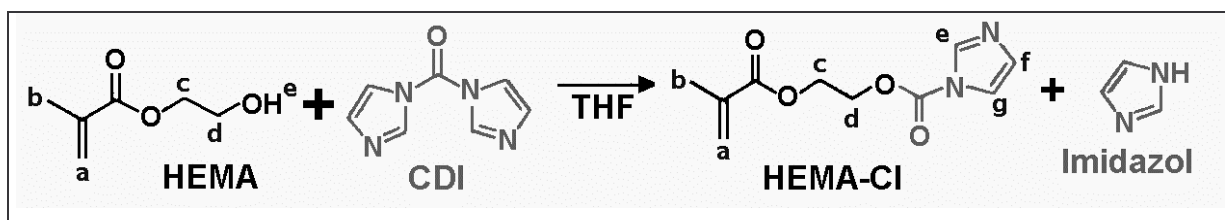


Abb. 43: Synthese einer reaktiven Zwischenstufe

Dazu wurde Hydroxyethylmethacrylat über eine Carbonatestergruppe an die Hydroxyethylstärke gebunden. Durch das Einfügen der Carbonatesterfunktion sollte dabei ein hydrolytischer Abbau des entstehenden Polymers ermöglicht werden. An der HES befinden sich verschiedene mögliche Bindungsstellen für eine Esterverknüpfung. Dabei ist die Bildung von Estern durch die Bindung an die Hydroxylfunktionen der α -1,4- verknüpften Glucoseeinheiten in Position 2, 3 und 6 denkbar, sowie an die gegebenenfalls vorhandenen Hydroxyethylfunktionen im Hydroxyethylstärkegerüst (siehe Abb. 44).

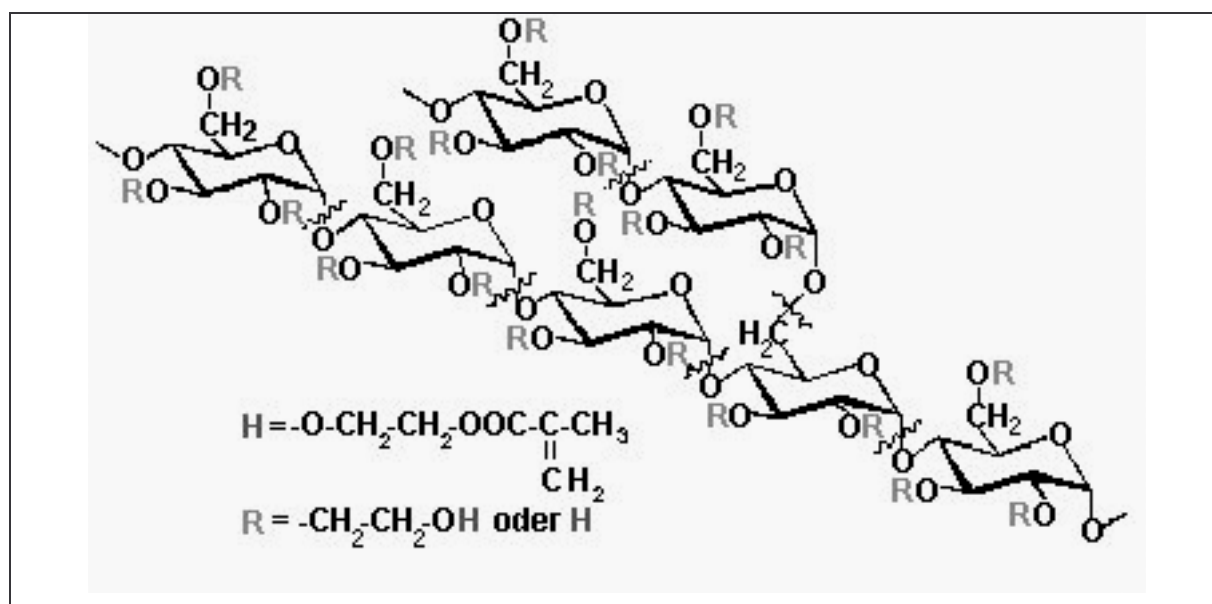


Abb. 44: Mögliche Substitutionsstellen (H) für HEMA in dem Gerüst der Hydroxyethylstärke

Die Synthese der polymerisierbaren Hydroxyethylstärke erfolgte in zwei Schritten. Im ersten Schritt wurde das polymerisierbare Hydroxyethylmethacrylat-Monomer (HEMA) mit äquimolaren Mengen an N,N'-Carbonyldiimidazol (CDI) in eine aktivierte Form gebracht, das Hydroxyethylmethacrylimidazolylcarbamate (HEMA-Cl) (siehe Abb. 43). Die Aktivierung der Hydroxylgruppe des Hydroxyethylmethacrylat wies man mittels H^1 -NMR nach. Gleichzeitig erfolgte eine dünnschichtchromatografische Kontrolle der voranschreitenden Reaktion.

Das H^1 -NMR zeigte eine Verschiebung des H_d -Signals des HEMA's von 3,7 ppm auf 4,5 ppm (siehe Abb. 45) nach der Reaktion mit Carbonyldiimidazol und ein gleichzeitiges Auftreten von Imidazolsignalen H_f bei 6,9, H_g bei 7,2 ppm und des H_e -Signals bei 8,00 ppm (siehe Abb. 45). Des Weiteren finden sich im H^1 -NMR die Peaks der beiden Protonen H_a der Doppelbindung im Hydroxyethylmethacrylat bei 6,1 ppm und bei 5,5 ppm wieder (siehe Abb. 45). In der untersuchten Probe finden sich auch Lösungsmittelrückstände von Ethylacetat aus der Aufreinigung der Zwischenstufe. Mit Hilfe des H^1 -NMR wurde ferner rechnerisch versucht, die Reinheit der Zwischenstufe zu ermitteln. Unter Verwendung des berechneten HEMA-Carbonylimidazol-Gehaltes in der Zwischenstufe ist es möglich, die verwendeten Mengen an HEMA-Cl bei der Umsetzung mit der Hydroxyethylstärke angeben zu können (siehe Abschnitt 3.2.4.3) und damit Aussagen zum Substitutionsgrad treffen zu können. Die

vorab theoretisch berechneten Mengen an HEMA-Cl für eine äquimolare Umsetzung mit HES wurden wie ermittelt für die zweite Reaktionsstufe eingesetzt (Abschnitt 3.2.4.1).

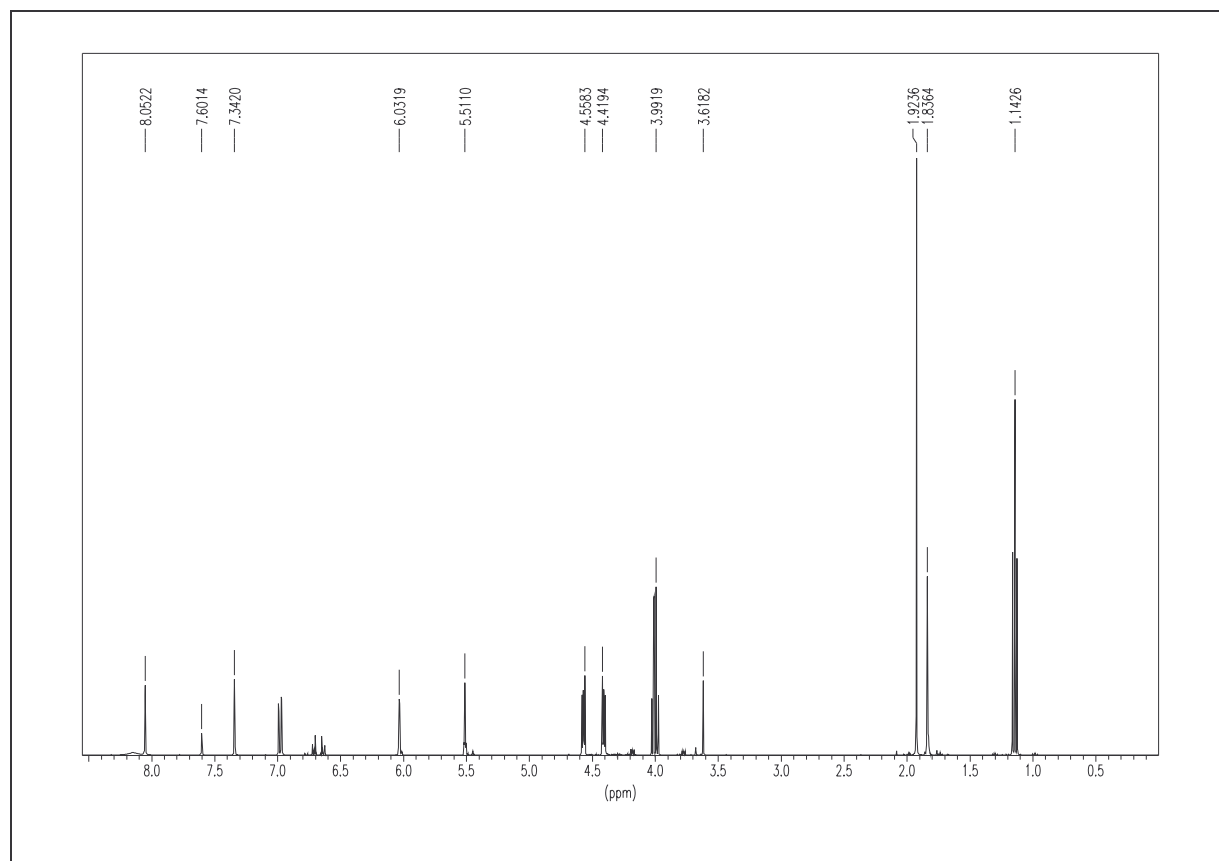


Abb. 45: ^1H -NMR von HEMA-Cl

Für die Berechnung des HEMA-Cl Anteils in der aufgereinigten Zwischenstufe erstellte man direkt nach Abschluss der Reaktion ein ^1H -NMR aus einer Probe. Dies war notwendig, da festgestellt wurde, dass sich die Probe aus der Zwischenstufe durch die Lagerung veränderte und die Anzahl von Signalen zunahm, welche keinem bekannten Reaktionsprodukt zugeordnet werden konnte (NMR nicht gezeigt).

Bei der Interpretation der Ergebnisse wurde davon ausgegangen, dass die Probe sich zu 100 % aus HEMA-Cl und Ethylacetat zusammensetzt, wenn keine weiteren Peaks im NMR gefunden werden konnten. Die Berechnung der Reinheit der Zwischenstufe erfolgte über das mittlere Mengenverhältnis von Ethylacetat zum HEMA-Cl, welches ermittelt wurde aus den Integralen der betrachteten Protonen der beiden Substanzen (siehe Abschnitt 3.2.4.3).

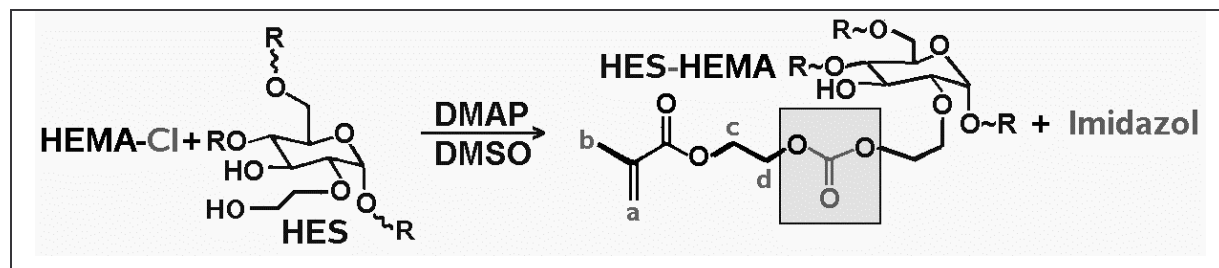


Abb. 46: Verknüpfung von HES mit HEMA- Cl

Bei einem errechneten mittleren Verhältnis Ethylacetat: HEMA-Cl von 1: 1,8 enthält die synthetisierte Zwischenstufe ca. 64,3 % an HEMA-Cl. Soll nun eine definierte Menge an HEMA-Cl für den Umsatz mit der Hydroxyethylstärke eingesetzt werden (Abb. 46), so muss die vorab kalkulierte Menge an HEMA-Cl korrigiert werden oder der vorab kalkulierte Umsatz und der damit mögliche Substitutionsgrad der Stärke muss korrigiert werden. Für ein molares Verhältnis von HEMA-Cl zu Glucoseeinheit von 0,25: 1 wird theoretisch eine Menge von 3,12 g reiner HEMA-Cl für die Umsetzung von 10 g Hydroxyethylstärke benötigt. Da die verwendete Zwischenstufe nur einen Gehalt von 64,3 % an HEMA-Cl aufweist, setzte man tatsächlich nur 2,01 g an reinem reaktiven Zwischenprodukt mit Hydroxyethylstärke um. Nimmt man an, dass die Zwischenstufe vollständig mit der Hydroxyethylstärke reagiert, ergibt sich ein molares Substitutionsverhältnis von 1 : 0,17, d.h. auf 10 Glucoseeinheiten kommen 1,7 Substitutionen mit HEMA, wenn die Zwischenstufe zu 100 % mit der Hydroxyethylstärke reagiert. Aufgrund der gemachten Analysen muss man jedoch davon ausgehen, dass die Umsetzung von HEMA-Cl mit HES zu HES-HEMA nicht zu einem vollständigen Umsatz führt. Es war keine hundertprozentige Umsetzung von HES mit HEMA-Cl unter den angesetzten Reaktionsbedingungen zu erreichen.

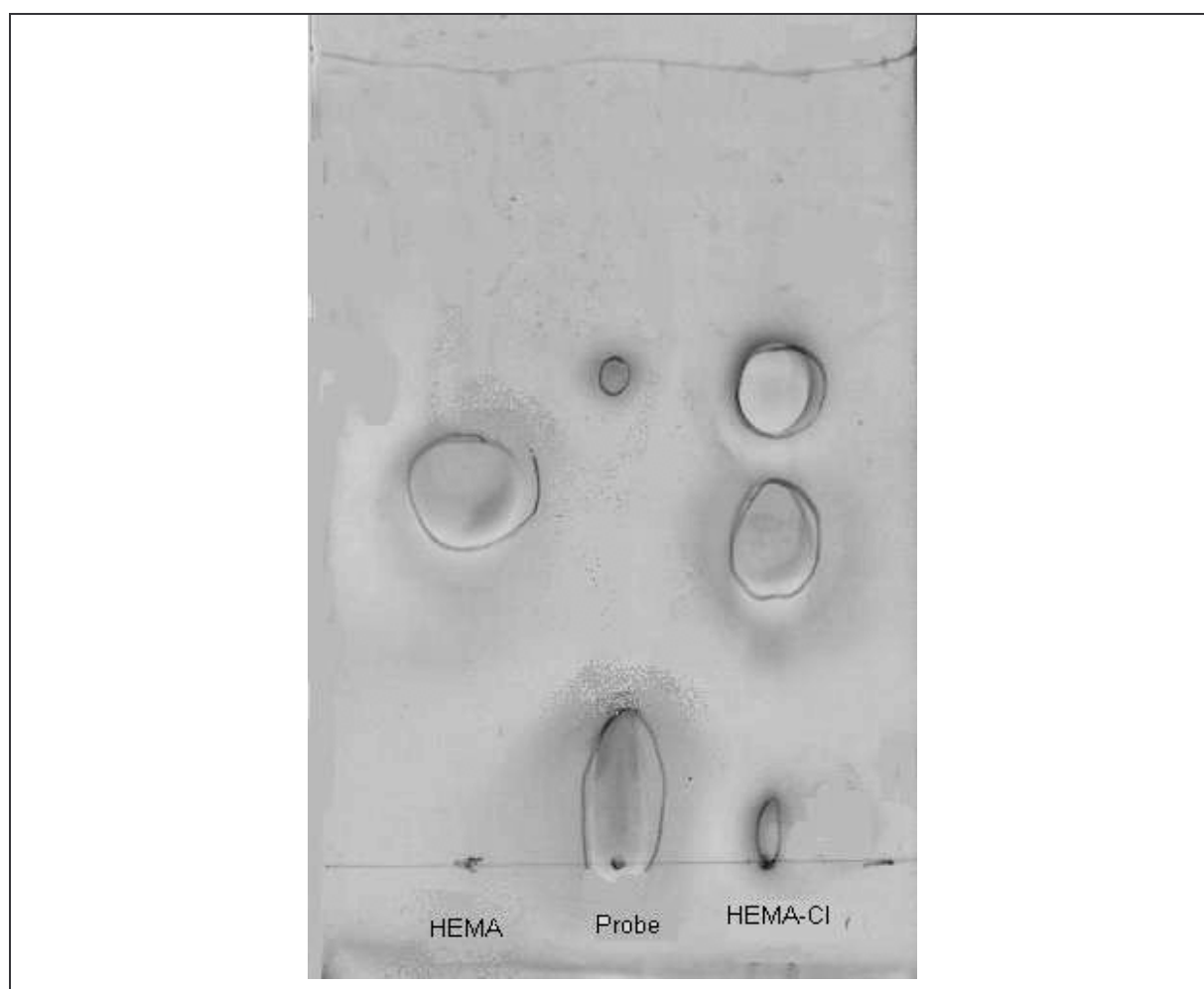


Abb. 47: Dünnschichtchromatographie einer Reaktionsprobe der Synthese von HES- HEMA im Vergleich zu HEMA und HEMA-Cl

Der Reaktionsablauf bei dem Umsatz von Hydroxyethylstärke mit HEMA-Cl wurde mittels DC-Analyse überwacht. Dazu nahm man aus dem Reaktionsgefäß eine Probe und ließ sie im Vergleich gegen HEMA-Cl und HEMA laufen (siehe Abb. 47). In der DC ist erkennbar, dass die HEMA-Cl Mischung bereits neben dem HEMA-Cl eine Verunreinigung aufweist. Es wird davon ausgegangen, dass es sich dabei um das Di(methacryloyloxyethyl)carbonat handelt, welches sich mit zunehmender Lagerung der Zwischenstufe aus HEMA-Cl und HEMA bilden kann. Die Reaktionsmischung weist diese Verunreinigung nicht auf, genauso wie das H1-NMR, weil für die Synthese eine ungelagerte Zwischenstufe Anwendung fand. Die Reaktion von HES mit HEMA-Cl erfolgte über mehrere Tage und wurde abgebrochen, wenn in der DC kein HEMA-Cl mehr nachweisbar war.

Das Reaktionsprodukt HES-HEMA wurde in Wasser dialysiert und gefriergetrocknet. Die erhaltene perlmuttartig schimmernde faserige Substanz charakterisierte man mit verschiedenen Methoden. Für die NMR-Bestimmung löste man die Substanz in DMSO. Die Messergebnisse zeigten zwischen 3,0 und 4,0 ppm einen deutlichen Mischpeak für die Protonen der Hydroxyethylstärke und bei 6,1 und 5,7 ppm finden sich wieder die Signale H_a der Doppelbindung in HEMA (siehe Abb. 48).

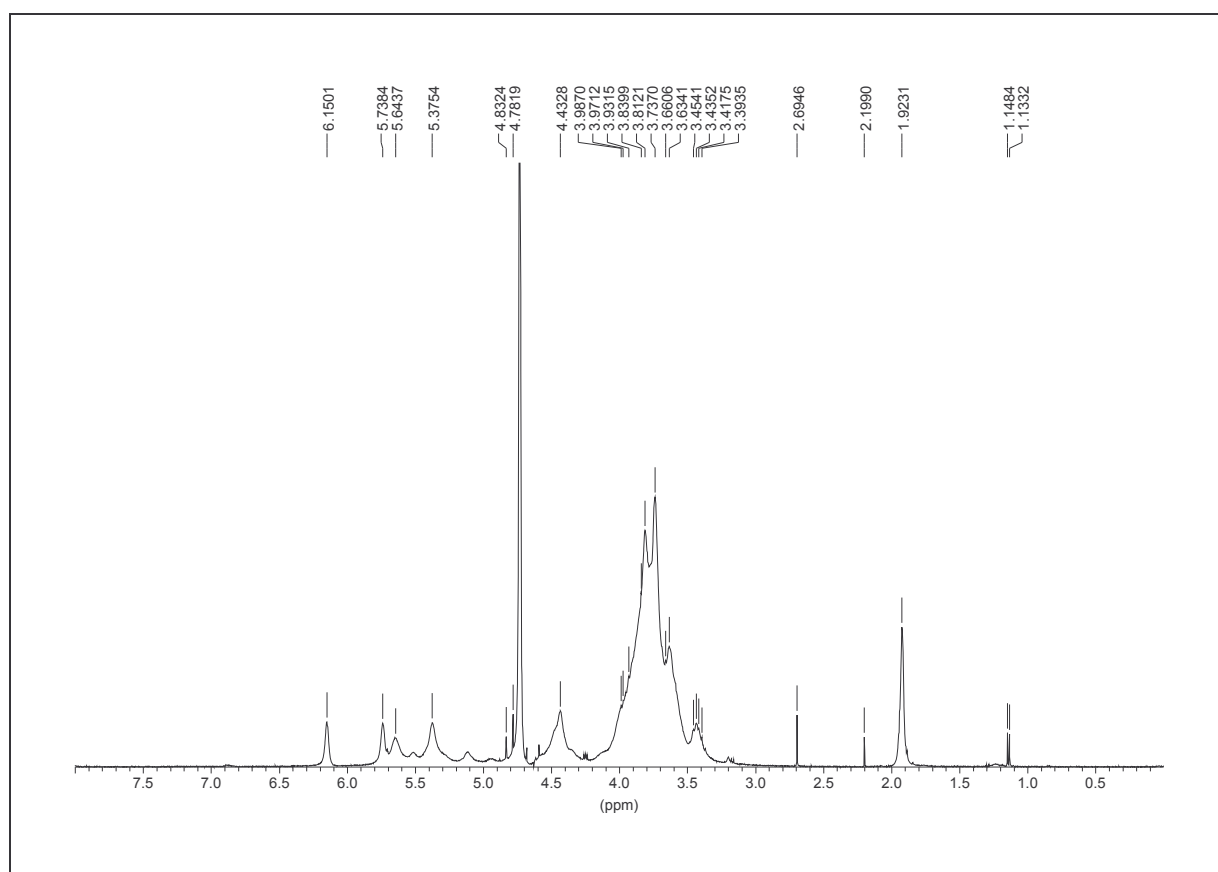


Abb. 48: 1H -NMR von HES-HEMA in deuterierten DMSO

Unter Verwendung der 1H -NMR Daten von dem Syntheseprodukt HES-HEMA erfolgten ebenfalls Berechnungen zur Ermittlung des Substitutionsgrades. Für den kleinen Syntheseansatz berechnete man einen DS von 0,14, d.h. 1,4 Substituenten auf 10

Glucoseeinheiten und für den Großansatz von DS 0,18. Damit liegen die aus dem ^1H -NMR ermittelten Substitutionsgrade sehr nahe an den rechnerisch ermittelten Substitutionsgrad der HES-HEMA.

Neben den NMR- Untersuchungen wurden IR und GPC Analysen an dem Endprodukt der Synthese durchgeführt. Dabei zeigen die aufgenommenen FT-IR-Spektren von Hydroxyethylstärke und HES-HEMA in Abbildung 49 charakteristische Valenzschwingungen für Alkohole im Bereich von 3200 bis 3600 cm^{-1} , welche von den Glucoseeinheiten der Stärke herrühren. Die dargestellten IR-Spektren unterscheiden sich hauptsächlich durch das Auftreten eines Peaks typisch für Carbonylverbindungen im Spektrum der HES-HEMA bei $1751,91\text{ cm}^{-1}$. Der Carbonylpeak deutet darauf hin, dass eine erfolgreiche Verknüpfung der Hydroxyethylstärke mit dem Hydroxethylmethacrylcarbamate stattgefunden hat und bestätigt die erhaltenen NMR- Ergebnisse.

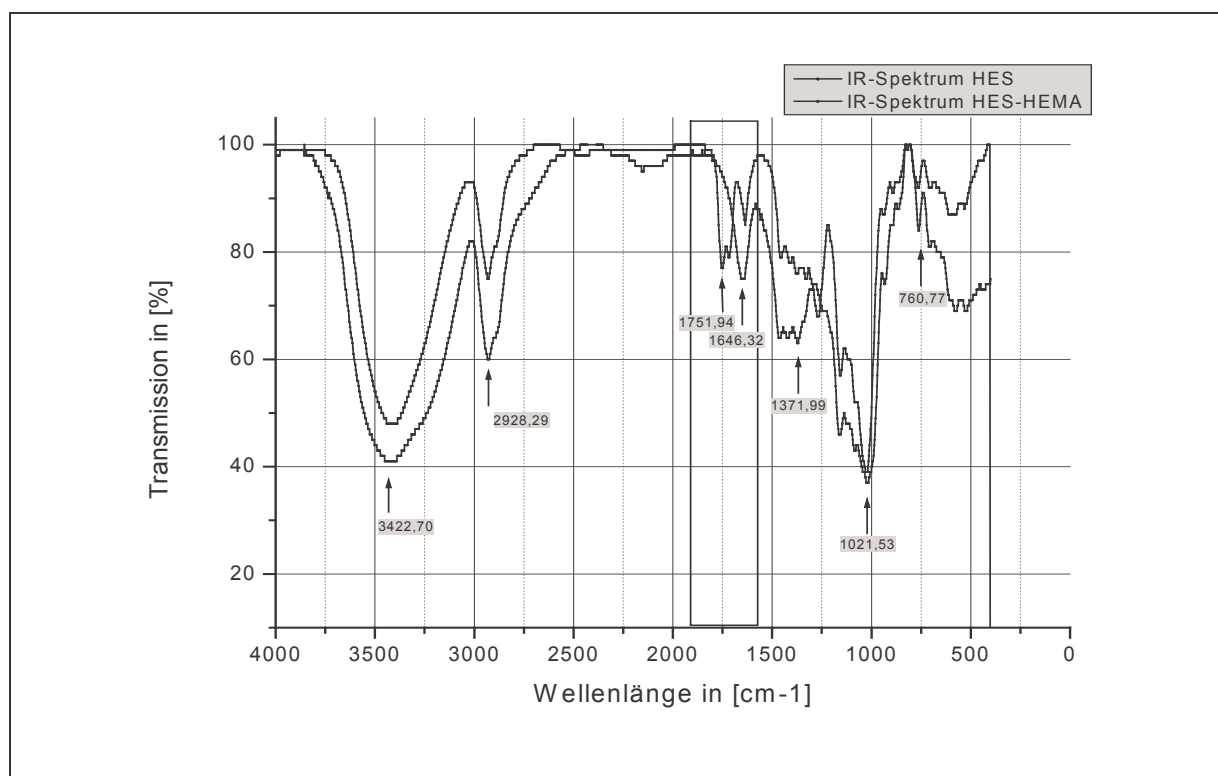


Abb. 49: IR-Spektren von Hydroxyethylstärke und HES-HEMA

Neben der Ermittlung der NMR- und IR-Daten erfolgte die Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung der Hydroxyethylstärke vor und nach der Derivatisierung mittels Gelpermeationschromatographie (GPC). Die gemessenen Werte für die verwendete HES 200.000 entsprachen den Angaben von Fresenius von $M_n 240.000 \pm 50.000$. Für HES-HEMA wurden deutlich höhere Werte ermittelt von $M_n 650.000 \pm 135.000$. Es wird davon ausgegangen, dass die ermittelten Werte eine teilweise begonnene Vernetzung der untersuchten HES-HEMA zeigen. Der Kurvenverlauf der erstellten GPC-Diagramme weist deutliche Anzeichen einer überlagerten Darstellung verschiedener

Molekülgrößenverteilungen auf (GPC nicht gezeigt). Des Weiteren muss bei der Auswertung der GPC-Daten berücksichtigt werden, dass für die Messung das HEMA-Derivat der Hydroxyethylstärke in DMF gelöst werden musste, welches nur durch langwieriges Schütteln möglich war. Durch den Energieeintrag ist ein Polymerisationsstart denkbar.

4.2.2 Ergebnisse der Synthese einer polymerisierbaren HES-HEMA

In den dargestellten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Herstellung einer mit HEMA verknüpften HES möglich ist. Dabei konnte für das erhaltene Syntheseprodukt nachgewiesen werden, dass die benötigten Doppelbindungen des Hydroxyethylmethacrylats für den späteren Polymerisationsvorgang unter den eingesetzten Bedingungen erhalten bleiben. Die Synthese wurde verwendet für die Umsetzung kleiner Mengen von 10 g HES zu HES-HEMA. Mit entsprechenden Versuchsreihen konnte gezeigt werden, dass auch die Herstellung größerer Mengen von 100 g mit dem ermittelten Verfahren möglich ist. Dabei wurde für die Synthese im kleinen Maßstab eine Ausbeute von 22,3 % an reinem HES-HEMA ermittelt. Der Großansatz ermöglichte nach verschiedenen Optimierungen eine HES-HEMA-Ausbeute von 96%.

4.3 Neue Methoden zur Herstellung von Mikropartikeln

Für die Herstellung von Mikropartikeln aus der mit Hydroxyethylmethacrylat derivatisierten Hydroxyethylstärke wurde, basierend auf einem publizierten Verfahren [2], eine neue Methode entwickelt. Die entwickelte Methode sollte es ermöglichen, den instabilen zweiphasigen Emulsionszustand nach dem Mischen von PEG mit HES bzw. HES-HEMA für einen Polymerisationsschritt zu nutzen. Dabei zeigt das wässrige Zweiphasensystem aus HES und PEG, wie in Abschnitt 4.1.2.1 beschrieben, bereits direkt nach der Durchmischung schon eine Separation der wässrigen HES-Phase in zunächst winzige Tröpfchen, verteilt in der PEG-reichen Phase, welche dann nach und nach zu einer einzigen Phase zusammenfließen. Die HES-Phase wuchs mit zunehmender Phasenseparationszeit, d.h. in einem Zeitfenster von 10 min bildete sich deutlich eine klare Einzelphase, deren Volumen unter der Klärung der PEG-Phase zunahm. Die zu entwickelnde Methode musste also sehr schnell die Polymerisation der eingefügten Hydroxyethylmethacrylatstrukturen ermöglichen. Als geeignetes Polymerisationsverfahren wurde die radikalische Photopolymerisation untersucht, welche schon auf vielfältige Weise bei der Polymerisation von Methacrylaten und deren Derivate in protischen Lösungsmitteln Anwendung findet [47, 88, 90, 91, 92]. Diese Methode ist geeignet, den Polymerisationsprozess schnell zu starten und innerhalb eines kurzen Zeitfensters abzuschließen.

Für die Initiierung des Photopolymerisationsprozesses wurde das α -Hydroxyketon 1-[4-(2-Hydroxyethoxy)-phenyl]-2-hydroxy-2-methyl-1-propan-1-on, auch Irgacure bzw. Darocure

2959 (Ciba), verwendet. Irgacure 2959 ist besonders geeignet für die Polymerisation von Acrylaten und zeigt im Gegensatz zu vielen anderen bekannten Photoinitiatoren eine ausreichende Wasserlöslichkeit [93]. Studien belegen zudem für das Irgacure 2959 eine gute Zytokompatibilität [94] in einem Konzentrationsbereich von 0,05-0,01 %.

4.3.1 Photopolymerisationsprozesse zur Herstellung von Mikropartikeln in wässrigen Zweiphasensystemen und deren Optimierung

Für die Entwicklung und Optimierung eines Photopolymerisationsverfahrens auf der Basis der Phasenseparation von Polymeren in wässrigem Medium erfolgten Testreihen mit variierenden Durchführungen und unterschiedlichem Aufbau. In den ersten Untersuchungen wurde der Polymerisationsschritt in einem konstant gerührten Zweiphasensystem aus HES-HEMA und PEG unter Zusatz von Irgacure in definierter Zusammensetzung bei Raumtemperatur (siehe Abschnitt 3.2.5.1) durchgeführt.

Dazu wurde anfangs willkürlich eine zweiphasige Mischung hergestellt und polymerisiert. Für diese Mischung zeigten sich schon während des Polymerisationsvorgangs einige ungewünschte Effekte, wie die Anlagerung von Partikeln aus polymerisierten HES-HEMA auf der Oberfläche der verwendeten Reaktionsgefäße. Gleichzeitig erfolgte sehr schnell während der Polymerisation die Separation der eingesetzten Mischung, welches zur Bildung großer, zusammenhängender HES-HEMA-Hydrogele mit mikropartikulären Anteilen führte.

Im Anschluss an diesen Versuch wurde mit Hilfe der Ergebnisse aus den Charakterisierungsuntersuchungen des Zweiphasensystems analysiert, welche Möglichkeiten sich bieten, die Separationszeit des Systems zu verlängern. Dazu boten sich verschiedene Untersuchungsansätze. Es wurde überprüft, ob die Separation durch das verstärkte Rühren der Probe während der Polymerisation behindert werden kann. Dabei zeigten die Ergebnisse dieser Versuche, dass sich durch das Rühren mehr Mikropartikel bildeten, aber zum einen sich auch mehr feinkörniges Material an den Oberflächen des Reaktionsgefäßes abschlug und zum anderen sich immer noch ein zusammenhängender Bodensatz aus HES-HEMA bildete.

Eine weitere Möglichkeit zur Verlängerung des Separationsvorgangs bot sich über die Verwendung von zweiphasigen Mischungen, welche sich in der Nähe der Phasengrenze befinden. Die eingesetzten Proben wurden während der Polymerisation gerührt. Das aufgereinigte Reaktionsprodukt zeigte keine größeren HES-HEMA-Verbindungen mehr, sondern bestand hauptsächlich aus einem feinkörnigen Pulver. In der Analytik dieser so produzierten Proben durch mikroskopische Untersuchungen war auf der Oberfläche der Mikropartikel ein großer Anteil an mit 50 –100 nm sehr kleinen körnigen Materials (siehe Abb. 50) nachweisbar.

Diesbezüglich wurde angenommen, dass durch den durchgeführten Rührprozess während der fortschreitenden Phasenseparation verhindert wurde, dass sich die separierende und polymerisierende HES-HEMA-Phase in größeren Tropfen sammelt und daher Kleinstpartikel in Nanometergröße polymerisiert wurden. Um die Bildung von diesen Kleinstpartikeln zu verhindern, wurde der Rührprozess ersetzt durch eine starke Durchmischung des Zweiphasensystems vor dem Start des Photopolymerisationsprozesses. Es wurden weiterhin Mischungen verwendet, welche nahe der Phasengrenze lagen. Dabei sollte die dadurch bewirkte Separationszeitverlängerung eine Phasentrennung während des Polymerisationsprozess behindern. Nach Auswertung der gemessenen Partikelgrößenverteilung und der mikroskopischen Aufnahmen aus den hergestellten Proben konnte ein wesentlich geringerer Anteil an Kleinstpartikelchen im Reaktionsprodukt nachgewiesen werden.

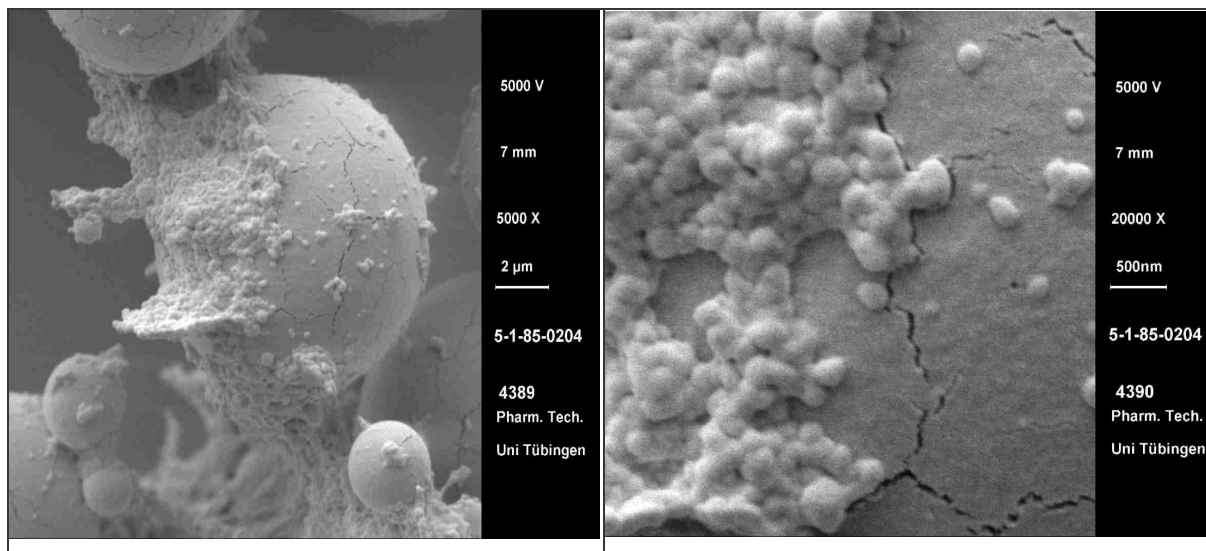


Abb. 50: REM Aufnahmen der Mikropartikeloberfläche von während des Polymerisationsprozess gerührten Proben

Für weitere Optimierungen des Photopolymerisationsprozesses erfolgten Untersuchungen zum Einfluss der Temperatur der Reaktionsmischung auf die gebildeten Partikel und ihre Größenverteilungen. Es ist bekannt, dass mit abnehmender Temperatur die Viskosität der Polymerlösungen zunimmt. Nun wurde untersucht, ob über eine Reduktion der Temperatur der Separationsprozess sich weiter beeinflussen lässt und damit die Partikelgrößenverteilung der Mikropartikel abnimmt.

Die Ergebnisse der mikroskopischen Untersuchungen und der Partikelgrößenverteilungsmessungen zeigten, dass es durch die Absenkung der Temperatur der Probe vor und während des Polymerisationsvorganges von Raumtemperatur $20 \pm 1^\circ\text{C}$ auf 4°C zu einer erheblichen Reduktion des Feinpartikelanteils kommt. In Abbildung 51 sind REM-Aufnahmen von den mit dem so optimierten Photopolymerisationsverfahren hergestellten Mikropartikeln zu sehen.

Des Weiteren untersuchte man auch den Einfluss der Konzentration der beiden Polymere in definierten Variationen auf das Polymerisat. So wurde der Anteil an HES-HEMA reduziert, um zu analysieren, welchen Einfluss die Konzentration auf die Entstehung des Kleinpartikel-Anteils hat. Auch die Verringerung des HES-HEMA Anteils sorgte für eine Verbesserung des Polymerisationsproduktes (Partikelgrößenverteilungen dargestellt in Abschnitt 4.3.2). Um aber eine ausreichende Menge an mikropartikulären Proben innerhalb eines Polymerisationsschrittes herstellen zu können, wurde anschließend die HES-HEMA Menge wieder leicht erhöht und gleichzeitig auch der PEG-Anteil in den Mischungen variiert. Dabei sollte die leicht erhöhte PEG-Menge die Ausbildung besser abgegrenzter HES-HEMA Tropfchen bzw. Partikel ermöglichen. Die Erhöhung der PEG-Konzentration diente jedoch auch dazu, die Erhöhung des HES-HEMA-Anteils auszugleichen.

Anschließend wurden mit dem so optimierten Photopolymerisationsverfahren proteinbeladene Mikropartikel hergestellt. Durch die Proteinbeladung verringerte sich der Anteil der Feinpartikel nicht weiter in nennenswertem Umfang (Abb. 51).

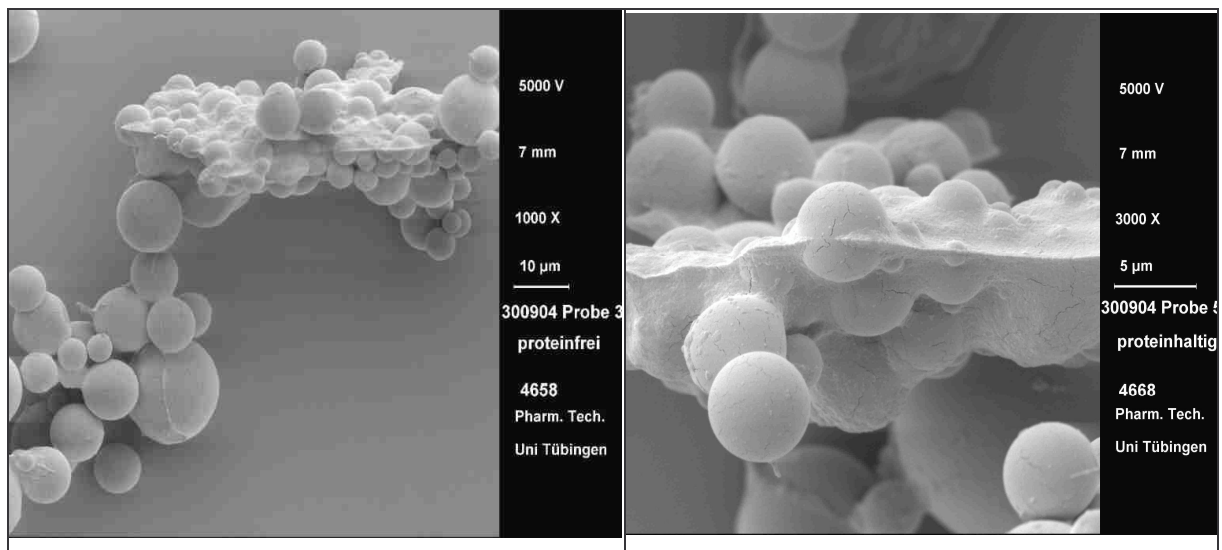


Abb. 51: REM- Aufnahmen der Mikropartikel hergestellt mit dem optimierten Photopolymerisationsverfahren ohne (links) und mit Proteinbeladung (rechts)

Es ist in den REM- Aufnahmen jedoch erkennbar, dass die Proben weiterhin einen gewissen Anteil an feinkörnigem Material aufweisen und dieser Feinkornanteil eine vermehrte Anreicherung in bestimmten Bereichen der Probe zeigt.

Zunächst war davon ausgegangen worden, dass die sichtbaren kleinen Körnchen fest mit der Oberfläche der Mikropartikel verbunden sind. Betrachtet man jedoch die Aufnahmen aus dem optimierten Mikropartikelherstellungsverfahren, so erscheint es, als hätte sich der Feinanteil erst durch den Gefriertrocknungsprozess während der Probenaufarbeitungsschritte an der Oberfläche der größeren Mikropartikel und zwischen den Partikeln niedergeschlagen.

Daraus ergab sich die Frage, ob sich diese Feinstpartikel beim Redispergieren im wässrigen Puffermedium weiterhin auf der Partikeloberfläche nachweisen lassen oder sich im Medium

verteilen. Sinnvolle Partikelgrößenmessungen zur Charakterisierung der Partikel im wässrigen Medium können wahrscheinlich nur vorgenommen werden bei einer Ablösung der Kleinstpartikel von der Oberfläche der Mikropartikel, sowie der Auflösung der durch den Gefriertrocknungsprozess entstanden Agglomerate.

Für die Untersuchung des Verhaltens der Kleinstpartikel in wässriger Lösung wurden entsprechende Mikropartikelproben in Wasser dispergiert und anschließend für Transmissionselektronenmikroskopischen-Aufnahmen (TEM) mit Gefrierbruchtechniken präpariert.

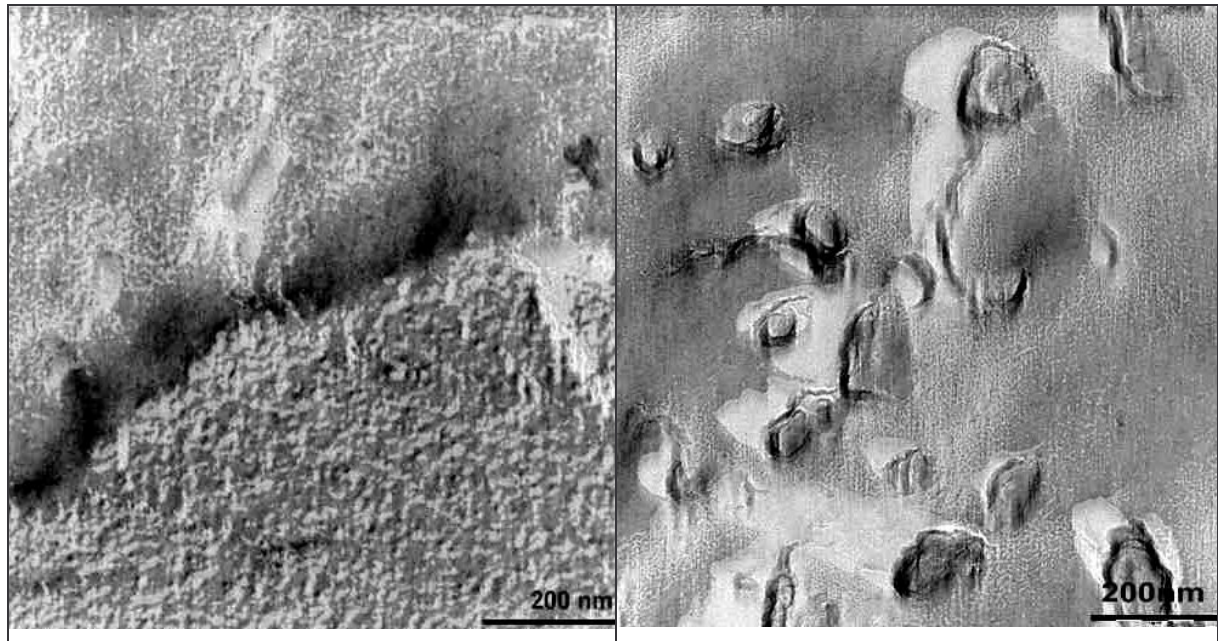


Abb. 52: TEM Aufnahme einer Mikropartikeloberfläche ohne Feinkornanteil (links) und des Feinkorns frei verteilt in einer proteinfreien wässrigen Mikropartikelsuspension

In dem ersten Bild in Abbildung 52 ist ein Teilausschnitt eines Mikropartikels erkennbar, an dessen Oberfläche sich keine Partikel in der Größe 50 -100 nm nachweisen ließen. Stattdessen kann man, verteilt im Medium, entsprechend große Partikel finden (siehe Abb. 52 rechtes Bild). Die TEM-Bilder zeigen, dass sich die Feinstpartikel in wässriger Lösung nicht mehr auf der Oberfläche der größeren Partikel finden lassen, sondern sich eigenständig und von einander getrennt im Medium verteilen.

Anhand der durchgeführten Untersuchungen mit Hilfe mikroskopischer Verfahren und unter Ermittlung der Partikelgrößenverteilungen (siehe Abschnitt 4.3.2) wurde festgestellt, dass mit dem neu entwickelten Photopolymerisationsverfahren die Möglichkeit besteht, schnell und schonend Partikel im Mikrometerbereich herzustellen. Für die optimale Herstellung dieser Mikropartikel war es notwendig, das Polymerisationsverfahren durch die Veränderung verschiedener Größen, wie der Reduktion der Temperatur, der Analyse mechanischer Einflüsse und der Verschiebung der Konzentrationsverhältnisse von HES-HEMA und PEGs zu verbessern. Dabei konnte eine Reihe von Erkenntnissen aus den Charakterisierungsuntersuchungen des Zweiphasensystems für diese

Verfahrensentwicklung genutzt werden. Durch die Verwendung von (HES-HEMA)-PEG-Mischungen nahe der Phasengrenze und über die Reduktion der Temperatur der zu polymerisierenden Mischung konnte über einen ausreichenden Zeitbereich eine Art stabile Wasser in Wasser-Emulsion aus dem Zweiphasensystem hergestellt werden. Damit war es möglich, ein gleichmäßigeres Polymerisationsprodukt zu erhalten mit einem sehr geringen nanopartikulären Feinkorn-Anteil (50-100 nm). Für die verbleibenden Anteile an Kleinstpartikeln in dem Polymerisationsprodukt wäre es interessant, ein Verfahren zur Abtrennung dieser Bestandteile zu entwickeln.

4.3.2 Charakterisierung der Partikel unter Berücksichtigung des Einflusses der verwendeten Herstellungsparameter

Für eine weitere und detailliertere Charakterisierung der hergestellten Mikropartikel wie der Ermittlung der Partikelgrößenverteilung wurden Proben aus den verschiedenen Photopolymerisationsexperimenten mit verschiedenen Partikelgrößenbestimmungsmethoden untersucht (siehe Abschnitt 3.2.5.3). Dabei musste für die Analyse der Partikelgrößen berücksichtigt werden, dass die entwickelten Partikel in wässrigem Milieu Quellung zeigen und die Eigenschaft besitzen, Agglomerate zu bilden.

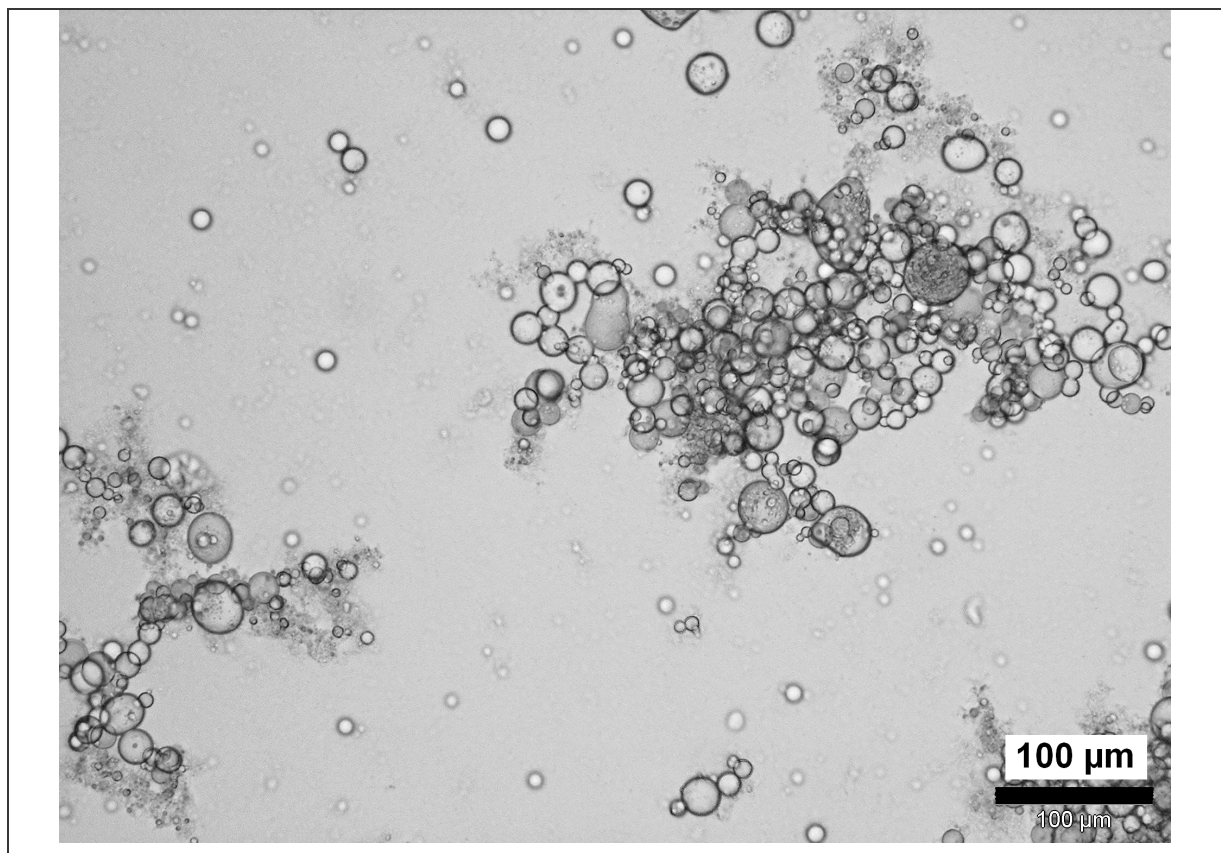


Abb. 53: Lichtmikroskopische Aufnahme von Mikropartikel- Agglomeraten

Nach jedem Polymerisationsprozess erfolgte eine lichtmikroskopische Betrachtung der hergestellten Proben, um eine grobe Abschätzung des Anteils an nicht mikropartikelförmigen

Anteilen (Artefakten) machen zu können. Polymerisationsansätze mit geringen Anteilen an runden 1- 50 μm großen Partikeln wurden nicht weiter untersucht und verworfen.

Alle anderen Proben gelangten in die Probenaufbereitung wie unter Abschnitt 3.2.5.2 beschrieben. Anschließend erfolgte eine Analyse aller Proben im Lichtmikroskop (Zeiss). Hier zeigte sich deutlich, dass die hergestellten Mikropartikel eine hohe Tendenz zur Agglomeratbildung haben (siehe Abb. 53).

Für die Partikelgrößenbestimmung wurde unter anderem der LS Particle Size Analyzer von Beckmann Coulter verwendet. Dazu brachte man die Proben der gefriergetrockneten Mikropartikel direkt in die mit Wasser gefüllte Messzelle des Gerätes ein und vermaß sie. Die ersten Ergebnisse dieser Messung zeigten jedoch in Abhängigkeit von der Zeit und der Rührgeschwindigkeit, sowie in Abhängigkeit von der verwendeten Stichprobe aus einer Charge sehr unterschiedliche Partikelgrößenverteilungen für ein und dieselbe Probe. In der Folge stellte man fest, dass die gefriergetrockneten Proben im Gerät nicht ausreichend dispergiert wurden. Aus diesem Grund wurden die zu vermessenden Proben auf unterschiedlichen Wegen aufbereitet und anschließend untersucht, um den Einfluss der Dispergierung auf die gemessene Partikelgrößenverteilung beurteilen zu können. Als Ursache für die sehr heterogenen Ergebnisse bei der Bestimmung der Partikelgrößenverteilung wurde eine starke Tendenz der Partikel zur Agglomeratbildung vermutet. Es wurde angenommen, dass ein Teil der im PIDS gemessenen Partikelgrößen nicht einzelnen Partikeln zuzuordnen ist, sondern Agglomerate beschreibt und dass die sehr heterogenen Ergebnisse folglich auf die hohe Agglomeratbildung der Partikel zurückzuführen sind.

Aus diesem Grund wurde untersucht, ob sich die Bildung von Agglomeraten durch die Verwendung von Natriumdodecylsulfat (SDS) bei der Redispergierung reduzieren lässt. Wie in Abbildung 54 gezeigt, reduzierte sich durch den Zusatz von SDS der gemessene D10-, D50- und D90-Wert um ca. 5-10 μm , bei einer konstanten Rührgeschwindigkeit im PIDS von 70 %. Wird die Probe zusätzlich noch für 5 min im Ultraschallbad vordispergiert, verringert sich die Breite der Partikelgrößenverteilung weiter und der D90 Wert verkleinerte sich im Vergleich zum Ausgangswert bei reinem Wasser ohne SDS um 45 μm und die erhaltene Partikelgrößenverteilung zeigte eine gleichmäßigere Verteilung. Nun besteht die Möglichkeit, dass die Mikropartikel durch die Behandlung im Ultraschallbad zerkleinert werden und sich dadurch die Partikelgrößenverteilungen ändern. Um einen solchen Effekt auf die Ergebnisse auszuschließen, wurden mit Ultraschall behandelte Proben lichtmikroskopisch untersucht. Dabei konnten keine Veränderungen an den entsprechenden Proben festgestellt werden.

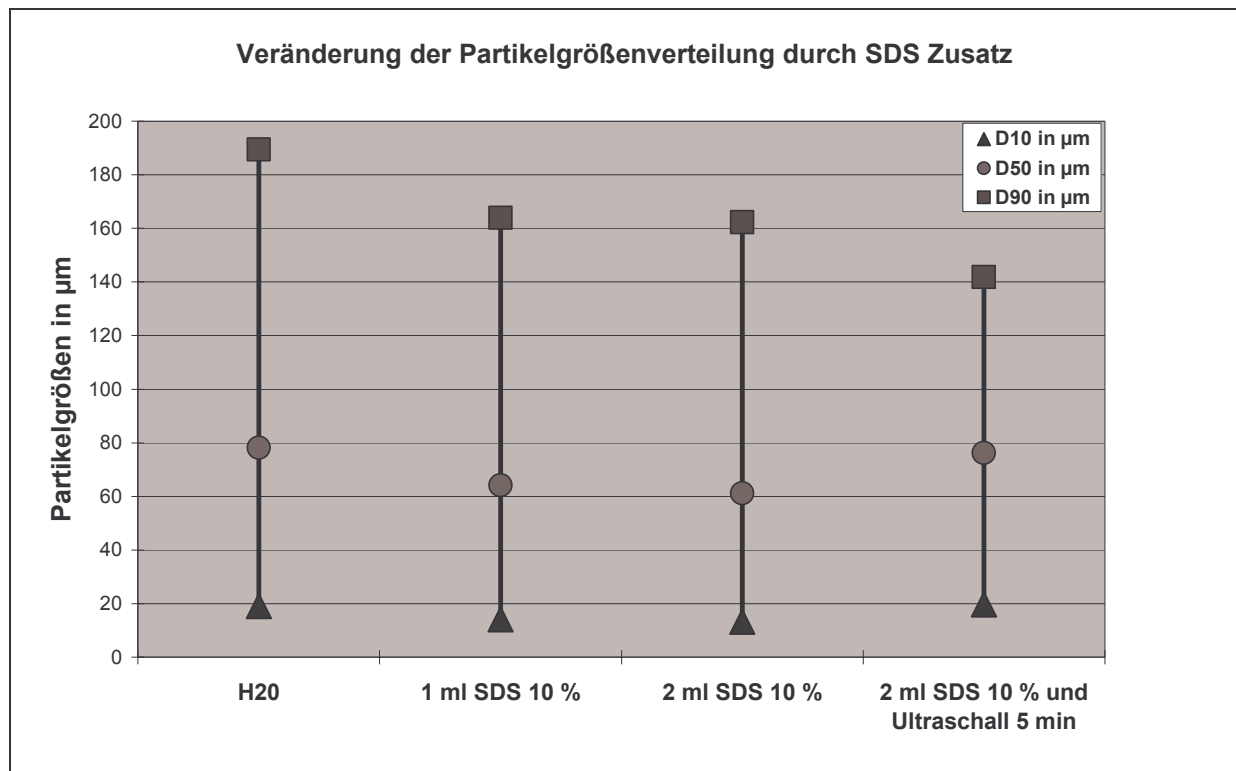


Abb. 54: Veränderungen einer im PIDS gemessenen Partikelgrößenverteilung durch Natriumdodecylsulfat (SDS) und Ultraschallbehandlung

Für alle weiteren Partikelgrößenbestimmungen dispergierte man daher die untersuchten Proben in einer wässrigen Suspension mit 2 ml 10 % SDS- Lösung und brachte sie anschließend in die Messzelle ein und vermaß sie. Aus den so aufgearbeiteten Versuchsstücken wurden mehrere Stichproben für Kontrollmessungen verwendet. Dabei zeigte sich, dass die ermittelten Werte nur für vergleichende Betrachtungen zwischen unterschiedlichen Mikropartikelproben herangezogen werden können.

Mit dem PIDS wurden die Proben aus den durchgeführten Photopolymerisationsprozessen für entsprechende Betrachtungen zur Optimierung des Herstellungsverfahrens untersucht. Die ermittelten Daten der Partikelgrößenbestimmung wurden verwendet, um herauszufinden, welche Veränderungen an der Durchführung der Photopolymerisation zur Verringerung der Partikelgrößenverteilung und zur Verbesserung des Reaktionsproduktes beitrugen.

In Abschnitt 4.3.1 wurde dazu bereits der Einfluss der Temperatur und damit der Viskosität der Phasen im Zweiphasensystem auf die Qualität der hergestellten Mikropartikel dargestellt. Des Weiteren ist auch in den vorangegangenen Betrachtungen auf den Einfluss der Konzentrationsverhältnisse von PEG und HES bzw. HES-HEMA auf die Separation und damit auch auf den Photopolymerisationsprozess eingegangen worden. Nach den ersten Optimierungsansätzen wurden die verwendeten Polymerisationsansätze auf zweiphasige Mischungen aus der Nähe der Binodalkurven umgestellt (Abb.55).

Für diese Mischung wurde dann untersucht, ob sich die Eigenschaften des Reaktionsproduktes noch weiter verbessern lassen durch entsprechende Änderungen der

Polymerkonzentration in einem begrenzten Rahmen und indem die Konzentration eines der beiden Polymere konstant gehalten wurde (siehe Abb. 55).

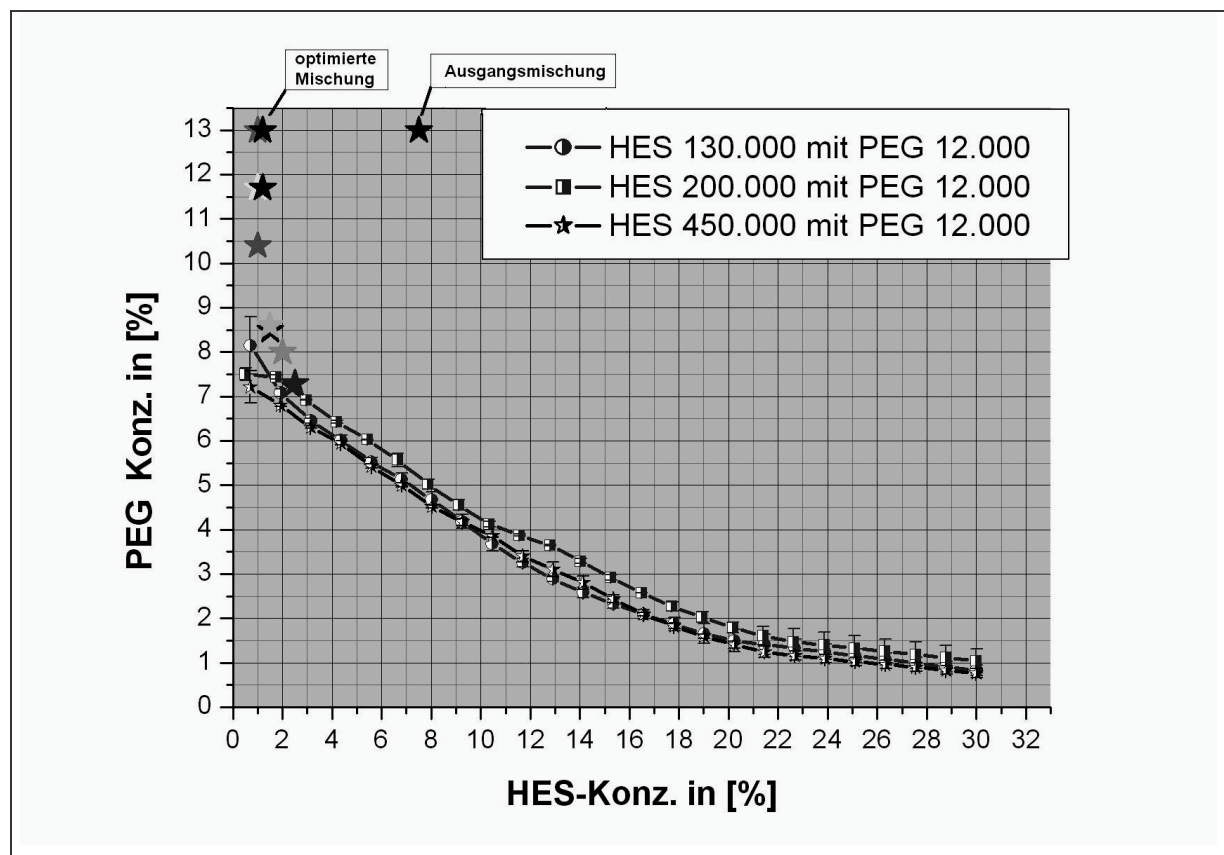


Abb. 55: Untersuchte Mischungsverhältnisse für die Photopolymerisation

Für die so erhaltenen Reaktionsprodukte erfolgte die Bestimmung der Partikelgrößenverteilung. Die Systeme mit den engsten Partikelgrößenverteilungen wurden dann für die Herstellung von proteinbeladenen Mikropartikeln verwendet und anschließend ebenfalls vermessen, um den Einfluss von definierten Mengen an Protein auf die Partikelgröße zu analysieren. In Abbildung 55 ist die Lage der optimierten Mischung im Phasendiagramm veranschaulicht.

Abbildung 56 zeigt für die gemessenen Partikelgrößenverteilungen die D10-, D50- und D90-Werte der verschiedenen untersuchten Mikropartikelproben. Für alle Proben wurden Partikelgrößen im Mikrometerbereich gemessen. Die im Diagramm angegebenen Probennummern entsprechen den in Tabelle 15 (Abschnitt 3.2.5.1) dargestellten Mischungen.

Dabei zeigen die Messbalken 1 bis 3 im dargestellten Diagramm während der Polymerisation gerührte Proben bei Raumtemperatur mit variierenden HES-HEMA / PEG Konzentrationsverhältnissen. Für die Ergebnisse der ersten drei Messbalken wurde die Konzentration von HES-HEMA im System von 2,5 % über 2,0% auf 1,0% reduziert und gleichzeitig der PEG-Anteil von 7,3 % auf 8,6 % erhöht. Es zeigt sich, dass sich durch die Reduktion des HES-HEMA Anteils und der Erhöhung der PEG-Konzentration kleinere Mikropartikel mit einer engeren Partikelgrößenverteilung herstellen lassen.

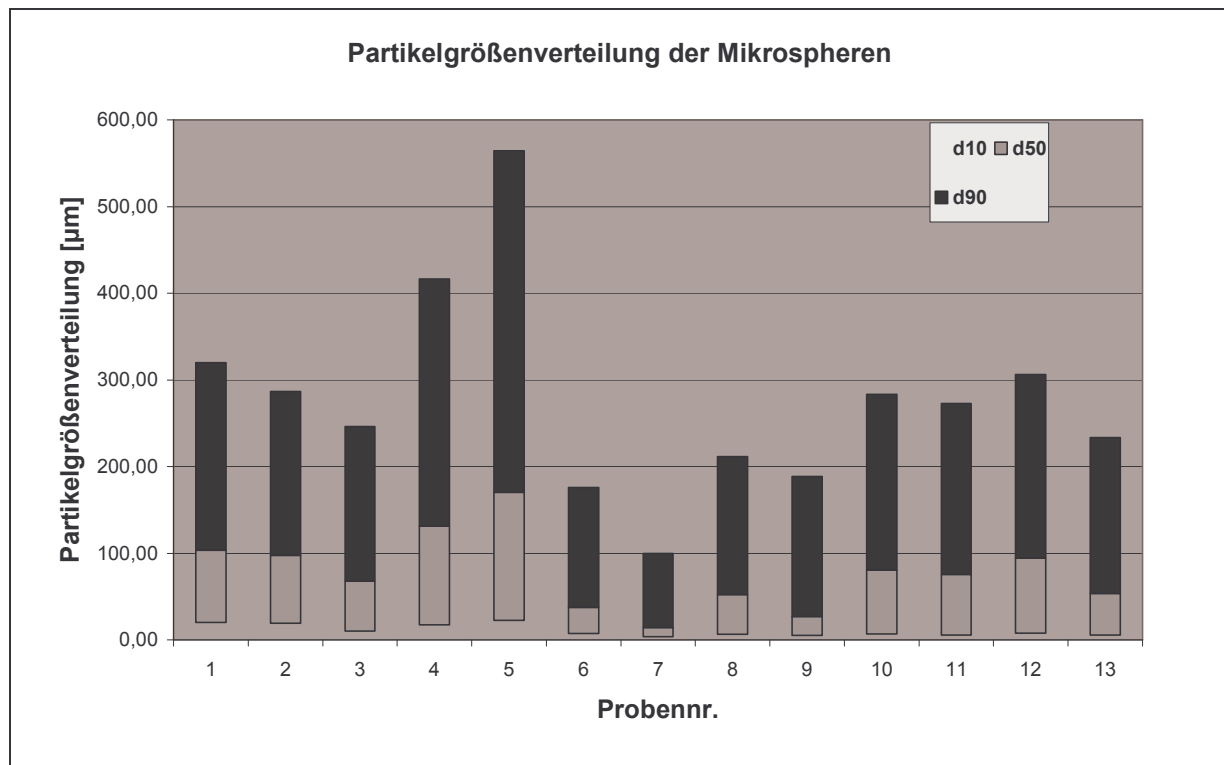


Abb. 56: D_{10} , D_{50} und D_{90} Werte für die Mikropartikel gemessen mit dem PIDS

Die Balken 4 bis 6 im Diagramm der Abbildung 56 zeigen den Einfluss einer konstanten und niedrigen HES-HEMA Konzentration von 1,0% und einem schrittweise erhöhten PEG-Konzentration (10,4%, 11,7%, 13%) auf die hergestellten Mikropartikel. Die Proben hatten Raumtemperatur und wurden vor dem Polymerisationsschritt gemischt. Durch die Erhöhung des PEG-Anteils wurde erwartet, dass sich Viskosität der Außenphase erhöht, was dazu führen könnte, dass die Phasenseparation sich verzögert und damit der Photopolymerisationsprozess gleichmäßiger abläuft. Gleichzeitig sollte die Erhöhung der PEG-Konzentration dazu dienen, dass sich der Anteil der PEG-Phase erhöht und damit die HES-HEMA-Tröpfchen in der Mischung seltener aufeinander treffen, um zu größeren Tröpfchen und damit zu größeren Partikeln zu koaleszieren. Die Ergebnisse zeigen hingegen anfänglich für Balken 4 und 5 eine breitere Partikelgrößenverteilung. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass mit zunehmender Polyethylenglykolkonzentration auch die Separationstendenz steigt (siehe Abschnitt 4.1.2) und damit die Phasentrennung schneller erfolgt. Erst ab einer bestimmten PEG-Konzentration kommt es zu einer ausreichenden Viskositätserhöhung, welche dann wiederum zu einer langsameren Separation führt und damit zu kleineren enger verteilten Mikropartikeln (siehe Balken 6).

Um den Verzögerungseffekt durch die Viskositätserhöhung auf die Phasenseparation und damit auf die gebildeten Partikelgrößen zu verstärken, wurden die nachfolgenden Proben vor dem Polymerisationsschritt auf 4° C gekühlt, gemischt und polymerisiert.

In den Proben zu Balken 7 bis 9 wurde im Vergleich zu den vorangegangenen Messungen der Anteil HES-HEMA wieder geringfügig erhöht. Die Erhöhung der HES-HEMA

Konzentration erfolgte, um die Ausbeuten des Polymerisationsschrittes zu erhöhen. Dabei ging es darum, die Mengen an HES-HEMA so zu wählen, dass es nicht wieder zu einer breiteren Partikelgrößenverteilung kommt. Für die Untersuchung wurde die Konzentration des PEGs bei 13% konstant gehalten. Die Ergebnisse zeigen in Balken 7 ein Optimum für die Einstellung (HES-HEMA)-PEG-Verhältnisses unter Steigerung der Ausbeute an Mikropartikeln. Dabei wird HES-HEMA in einer Konzentration von 1,2% eingesetzt. Das Diagramm zeigt für diese Mischung eine deutliche Verbesserung der Partikelgrößenverteilung. Erst mit der weiteren Erhöhung der HES-HEMA-Konzentration auf 1,3 % bzw. 1,8 % beginnt die Partikelgrößenverteilung wieder breiter zu werden (siehe Balken 8 und 9 der Abb. 56).

Die Balken 10 bis 12 zeigen die Ergebnisse der optimierten und endgültig eingesetzten Polymerisationsmethode (Balken 6) mit gleichzeitiger Proteinbeladung. Es wird festgestellt, dass durch die Proteinbeladung die Proben größere Partikel ausweisen. Bei den diesbezüglichen Untersuchungen konnte keine Abhängigkeit der Partikelgröße von der eingesetzten Proteinmenge festgestellt werden. Daher wird anhand der gemachten Ergebnisse angenommen, dass eine Proteinbeladungslimitierung besteht, definiert durch die eingesetzte Menge HES-HEMA und deren Substitutionsgrad, sowie der dadurch beeinflussten Vernetzung und das damit limitierte räumliche Aufnahmevermögen an Protein in die Mikropartikel. In Balken 13 ist die Polymersiationsmethode aus Balken 7 für die Herstellung von proteinbeladenen Mikropartikeln verwendet worden. Dabei zeigt sich, dass durch die Verwendung einer Herstellungsmethode für enge Partikelgrößenverteilungen auch die mit der gleichen Methode produzierten proteinbeladenen Partikel eine engere Verteilung aufweisen.

Ein weiteres Augenmerk der Partikelgrößenuntersuchungen betraf die Eigenschaften der hergestellten Mikropartikel im Bezug auf ihre Quelleigenschaften.

Es ist bekannt, dass Hydroxyethylstärke in wässrigem Medium ein Hydrogel ausbildet. Durch die Einlagerung von Wasser zwischen den Polymerketten kommt es zur Volumenzunahme und zur Vergrößerung der Abstände zwischen den Polymerketten [45], die Substanz quillt. Da die entwickelten Mikropartikel einen hohen Anteil an Hydroxyethylstärke enthalten, war es interessant zu untersuchen, ob diese Partikel trotz der chemischen Derivatisierung mit Hydroxyethylmethacrylatgruppen (HEMA) in der Lage sind, in wässrigem Medium zu quellen und inwieweit die Quellung begrenzt wird durch die chemische Vernetzung. Für die Untersuchungen wurden gefriergetrocknete Mikropartikelproben mit einem weiteren Partikelgrößenbestimmungsverfahren untersucht. Das eingesetzte Verfahren erstellt Partikelgrößenverteilungen auf Basis von Lichtmikroskopischen Aufnahmen der entsprechenden Proben (siehe Abschnitt 3.2.5.3.2).

Durch das veränderte Partikelgrößenanalyseverfahren wurden deutlich veränderte Partikelgrößenverteilungen gemessen (siehe Abb. 57). Dabei weisen die Proben Partikelgrößen von 1 μm bis 9 μm auf.

Abbildung 57 zeigt die Partikelgrößenverteilung von einer nicht gequollenen und anschließend gequollenen Probe. Dabei befanden sich die ungequollenen Partikel maximal 5 min in wässriger Lösung und zeigen eine mittlere Korngröße bei ca. 3 μm . Diese Proben wurden nach der Vermessung in wässriger Lösung gelagert und dann nach einer Woche wiederum analysiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen eine deutliche Zunahme der Partikelgrößenverteilung der analysierten Partikel in den Proben. Hierbei lag die mittlere Korngröße bei ca. 6,78 μm . Ausgehend von diesem Ergebnis wurde davon ausgegangen, dass die Partikel durch Quellung an Größe zugenommen haben. Untersucht man diese Proben über eine weitere Woche, kann keine weitere Partikelgrößenzunahme festgestellt werden, welches darauf hindeutet, dass die Hydrogelmikropartikel die maximale Quellung erreicht haben.

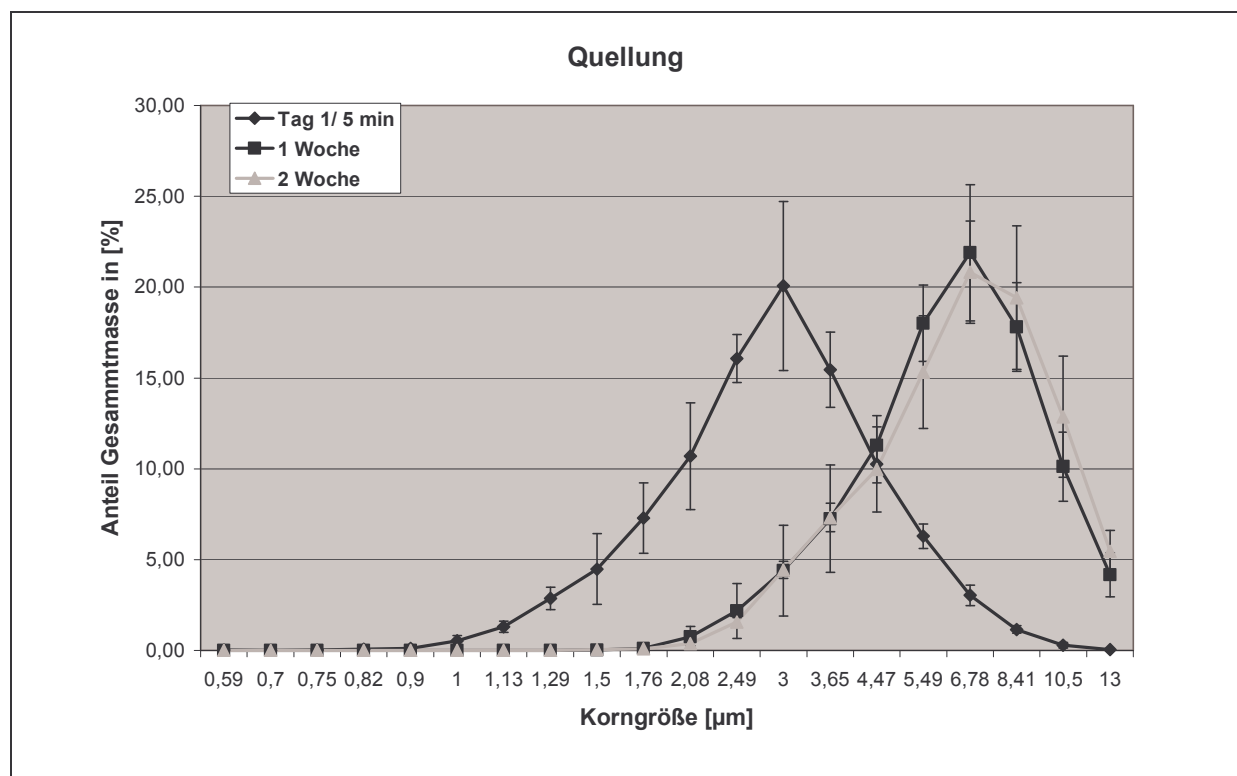


Abb. 57: Partikelgrößenverteilung Mikropartikel (endgültige Herstellungsmethode) untersucht über die elektronische Auswertung lichtmikroskopischer Bilder

Die Ergebnisse zeigen, dass die neu entwickelten Hydroxyethylstärke-Mikropartikel trotz chemischer Derivatisierung in der Lage sind, begrenzt quellbare Hydrogele zu bilden. Für die Freisetzung von Proteinen aus den hergestellten Mikropartikeln ist die Quellung der Partikel von Bedeutung. Wird Wasser in ein hydrogelbildendes System aufgenommen, erfolgt als erstes die Hydratation der polaren Gruppen und führt zu einer Aufquellung der gegebenen Strukturen. Durch den Quellungsprozess werden die unpolaren Bereiche freigelegt, welche

dann ebenfalls mit den Wassermolekülen Wechselwirkungen eingehen können. Das bei diesen Prozessen eingelagerte Wasser liegt in gebundener Form vor. Kommt es aufgrund des osmotischen Druckes zur weiteren Wasseraufnahme, handelt es sich hierbei um freies Wasser. Dieses freie Wasser ist bedeutend für den Stofftransport im Hydrogel, sowie für die Aufweitung des Gelgerüsts unter Bildung von Poren [8].

Betrachtet man die HES- Hydrogelmikropartikel, so wird freies Wasser benötigt, um bei einer entsprechenden Proteinbeladung diese Moleküle zu solvatisieren und deren Transport aus dem Partikel zu ermöglichen.

Des Weiteren ist die Ausbildung einer hydrogelartigen Struktur von entscheidender Bedeutung für die geplante Anwendung als implantierbares, biologisch abbaubares Arzneistofffreisetzungssystem. Verschiedene Studien zeigen eine deutlich bessere physiologische Verträglichkeit von Hydrogelen [8]. Durch die hydrophile Oberfläche neigen Proteine und Zellen weniger dazu, sich daran anzulagern und Wechselwirkungen einzugehen [9].

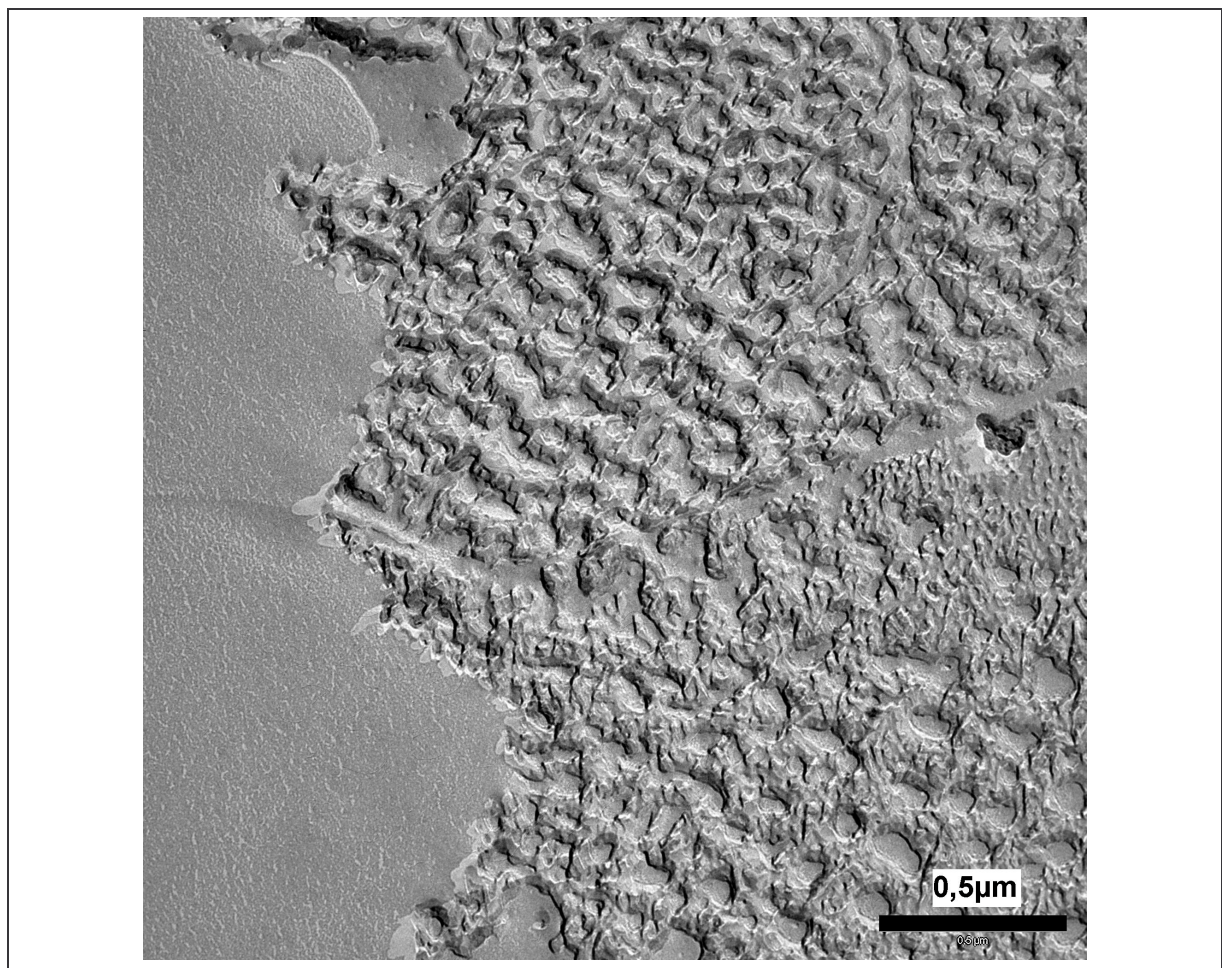


Abb. 58: TEM- Aufnahme eines gequollenen und mittels Gefrierschnitt präparierten Mikropartikel

Ein weiterer wichtiger Aspekt der Wasseranreicherung und Quellung in den entwickelten Mikropartikeln ist der Abbau der Hydroxyethylstärkepartikel. In die neu entwickelten Partikel wurden hydrolytisch abbaubare Bindungsstellen zwischen den Hydroxyethylmethacrylat und

den Stärkekettten in Form von Carbonatesterfunktionen eingebaut. Durch diese Bindungen sollte eine leichtere Degradation der Mikropartikel erfolgen können und damit auch die Proteinfreisetzung über den Abbau des Hydrogelgerüsts ermöglicht werden.

Anhand von TEM-Aufnahmen von gequollenen und mittels Gefrierschnitttechnik präparierten Partikeln war es möglich, einen Einblick in die innere Strukturierung zu erhalten. In Abbildung 58 ist eine derartige TEM-Aufnahme gezeigt. Es sind in den Proben höher- und tiefer liegende Strukturen zu erkennen. Es wird davon ausgegangen, dass es sich bei den tiefer liegenden Bereichen um Hohlräume in der Mikropartikelstruktur handelt, welche durch einen weiteren Phasenseparationsprozess während der Photopolymerisation entstehen. Dagegen zeigen die übrigen Verwerfungen das eigentliche Gelgerüst. Dabei haben die meisten Vertiefungen und Hohlräume eine Größe im Bereich von 100 nm. Für Lysozym ist eine Faltung über vier Disulfidbrücken und zahlreiche Wasserstoffbrücken zu einer ellipsoiden Gestalt von etwa 4,5*3,0*3,0 nm dokumentiert [30], wobei hier die Veränderungen der Struktur durch Wechselwirkungen mit anderen Stoffen nicht berücksichtigt sind. Durch die nachgewiesenen Hohlräume besteht jedoch die Möglichkeit, dass sich Proteine an zwei Aufenthaltsorten in die entwickelten Mikropartikel einlagern können. Es besteht zum einen die Möglichkeit der Anreicherung von Lysozym in den genannten Hohlräumen und zum anderen im eigentlichen Hydrogelgerüst der HES-HEMA-Partikel.

4.3.3 Zytotoxizitätstest

Für den Nachweis der physiologischen Unbedenklichkeit der neu entwickelten Hydrogelpartikel und der verwendeten Ausgangsmaterialien erfolgten Untersuchungen zur Zytotoxizität der eingesetzten Substanzen. Dabei wurden die Untersuchungen an menschlichen Fibroblasten HDF 8 mittels Neutralrottest durchgeführt.

Mit diesem Test können schädigende Effekte auf die Zelle über die Beeinflussung des Zellmetabolismus erfasst werden. In einer ungeschädigten Zelle wird der Farbstoff Neutralrot über Diffusion in die Zelle aufgenommen und hauptsächlich in den Lysosomen gespeichert. Bei Neutralrot handelt es sich um eine schwache Base, welche elektrostatische Bindungen mit sauren Gruppen der lysosomalen Matrix eingehen kann [75]. Erfolgt eine Schädigung der untersuchten Zellen durch die verwendeten Testsubstanzen ist sie nicht mehr in der Lage, den Farbstoff zurückzuhalten. Anschließend lassen sich mit Hilfe von vergleichenden Untersuchungen an mit Testsubstanz inkubierten Proben und an Blindproben durch photometrische Messungen Schädigungen der verwendeten Fibroblasten ermitteln.

Die Abbildung 59 zeigt die Einflüsse der untersuchten Substanzen auf den Neutralrotgehalt der HDF 8 Zellen. Getestet auf ihre zytotoxischen Eigenschaften wurden die für die Mikropartikelherstellung verwendeten Stoffe. Dazu zählen die derivatisierte Hydroxyethylstärke (HES-HEMA), das Polyethylenglykol und der Photoinitiator Irgacure 2959.

Diese einzelnen Substanzen, sowie deren Mischung und die daraus hergestellten Mikropartikel wurden auf ihre zellschädigenden Effekte untersucht. Für die HES-HEMA, sowie den aus ihr gewonnen Hydroxyethylstärkepartikeln und dem verwendeten Photoinitiator zeigen die Ergebnisse des Zytotoxizitätstests keine signifikanten schädigenden Einflüsse auf die Fibroblasten. Die polyethylenglykolhaltigen Proben hingegen zeigen einen deutlich konzentrationsabhängigen zellschädigenden Einfluss auf die Fibroblasten. Es wird davon ausgegangen, dass diese Schädigung vom PEG ausgelöst wird, da es sich bei diesem Polymer um eine stark osmotisch aktive Substanz handelt. Durch den Entzug von Wasser ist die Möglichkeit der Zellschädigung gegeben.

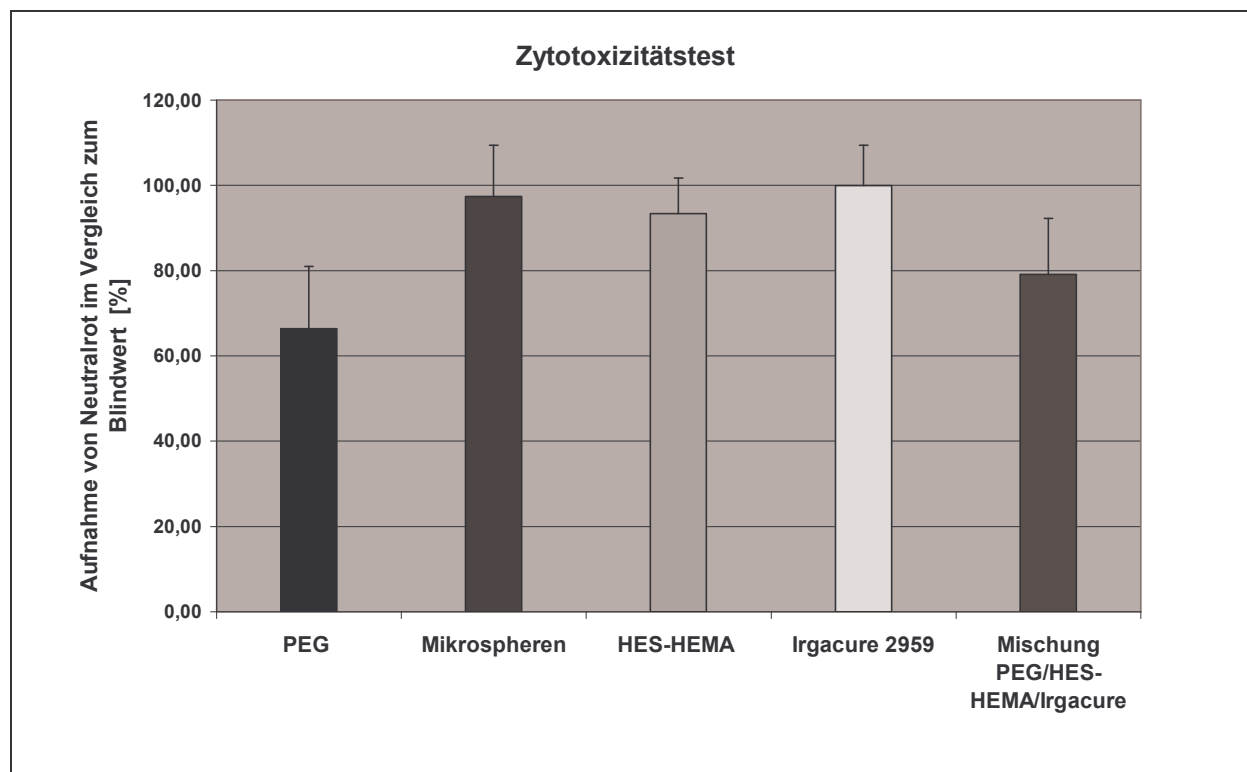


Abb. 59: Vergleichende Darstellung der Neutralrotaufnahme in HDF 8 (n=4)

Anhand der erhaltenen Daten ist davon auszugehen, dass die entwickelten Hydroxyethylstärkepartikel nach einer geeigneten Aufbereitung zur Entfernung jeglicher polyethylenglykolhaltiger Reste keine zytotoxischen Effekte auf humane Fibroblasten haben.

4.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse für die neu entwickelten HES-HEMA-Mikropartikel

In den durchgeführten Studien konnte gezeigt werden, dass es möglich ist mit Hilfe des entwickelten Photopolymerisationsverfahrens im wässrigen Zweiphasensystem aus der mit Hydroxyethylmethacrylat derivatisierten HES rundliche Partikel herzustellen. Durch Optimierungen des entwickelten Mikropartikelherstellungsverfahrens über Faktoren wie die Konzentrationsverhältnisse von HES-HEMA zu PEG und die Temperatur war es möglich, die produzierten Partikelgrößen zu beeinflussen. Dabei weisen die so hergestellten Partikel

Größen im Bereich von 1-50µm auf, wie es für eine parenterale Applikation wünschenswert ist. Weitere Untersuchungen zeigen, dass die hergestellten Mikropartikel im wässrigen Medium begrenzt quellen. Durch die Quellung besteht die Möglichkeit, dass aus proteinbeladenen Mikropartikel ein Stofftransport mit Hilfe des angereicherten Wassers erfolgen kann. Dabei können sowohl Protein, als auch abgebaute HES-HEMA-Bestandteile durch Diffusion aus dem Mikropartikel transportiert werden. Gleichzeitig ist die Wassereinlagerung in die Partikel von Interesse für einen leichteren Abbau der Partikel durch die Hydrolyse der eingebauten Carbonatesterfunktionen.

In weiteren Untersuchungen wurde festgestellt, dass die Partikel im Inneren durchzogen sind von einem vernetzten Hydrogelgerüst, welches Hohlräume von ca. 100 nm aufweist. Diese Hohlräume bieten neben dem eigentlichen Gelgerüst die Möglichkeit der Proteineinlagerung. Neben den Untersuchungen zur Optimierung des neu entwickelten Photopolymerisationsverfahrens und zur Charakterisierung der hergestellten Mikropartikel wurde die physiologische Unbedenklichkeit der verwendeten Substanzen und der produzierten Partikel überprüft. Dazu wurde ein Zytotoxizitätstest auf der Basis von Neutralrot durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen, dass von den entwickelten Mikropartikeln nach geeigneter Aufarbeitung zum Entfernen jeglicher PEG-Reste keine zytotoxischen Effekte auf humane Zellen zu erwarten sind.

4.4 Freisetzungsuntersuchungen von Lysozym aus den entwickelten Mikropartikeln

Abschließend wurden im Rahmen dieser Arbeit erste Untersuchungen zur Freisetzung von Proteinen aus Hydroxyethylstärkemikropartikeln durchgeführt. Dazu erfolgte die Entwicklung einer ausreichend empfindlichen und selektiven Methode zur Analyse der Proteinfreisetzung aus den Partikeln. Die entwickelten Verfahren dienen dazu, erste Aussagen zur Kinetik der Proteinfreisetzung aus den Hydrogelmikropartikeln machen zu können.

4.4.1 Entwicklung eines geeigneten in vitro- Verfahrens zum Freisetzungsverhalten der Hydroxyethylstärkemikropartikel

In den hier erläuterten Voruntersuchungen wurden verschiedene Verfahren zur Untersuchung der Proteinfreisetzung aus den Hydroxyethylstärkemikropartikeln getestet und optimiert.

In den aktuellen Publikationen wird für die Freisetzungsuntersuchungen hauptsächlich eine Methode beschrieben, bei welcher eine definierte Menge an Probenmaterial in eine Pufferlösung gegeben wird. Inkubiert in einem Wasserbad bei 37°C wird nach bestimmten Zeitintervallen etwas Pufferlösung entnommen und ersetzt. Diese Probenlösung wird dann auf ihren Proteingehalt analysiert [48, 95, 96]. Die mit diesem Verfahren erhaltenen

Ergebnisse zeigen starke Unterschiede zu ermittelten in vivo Daten [97]. Durch diese Methode ist die Möglichkeit gegeben, dass es aufgrund der Proteinanreicherung in dem Umgebungsmilieu der Partikel mit voranschreitender Proteinfreisetzung zur Reduktion des Diffusionsstroms aus den untersuchten Partikeln kommt. Des Weiteren besteht die Möglichkeit einer Proteinanlagerung an der Partikeloberfläche, welche ebenfalls die Ergebnisse dieser Untersuchungsmethode stark beeinflussen kann.

Aus diesem Grund wurde versucht, ein alternatives Verfahren für die Freisetzungsuntersuchungen so zu überarbeiten, dass es für unsere Anforderungen verwendbar wurde. Die Methode basiert auf einem Prinzip, bei welchem die freisetzenden proteinbeladenen Partikel durch eine Membran vom eigentlichen Akzeptormedium getrennt sind [97]. Dabei sollte gewährleistet werden, dass die eingesetzte Membran zwischen Donator und Akzeptormedium keine Limitierung der Proteinverteilung hervorrufen kann. Dies bedeutet, dass es durch eine falsche Membran erst zu einer verzögerten Umverteilung des aus dem Mikropartikel freigesetzten Proteins in das untersuchte Akzeptormedium kommen kann. Durch diese Verzögerung ist es möglich, dass eine retardierte Wirkstofffreisetzung ermittelt wird, welche nur auf der behinderten Passage des Proteins durch die verwendete Membran beruht. Gleichzeitig sollte sichergestellt werden, dass das eingesetzte Puffermedium noch nachweisbare Proteinkonzentrationen enthalten kann, sodass das Puffervolumen nicht zu groß angesetzt wird im Bezug auf die untersuchte Menge an freisetzenden Mikropartikeln.

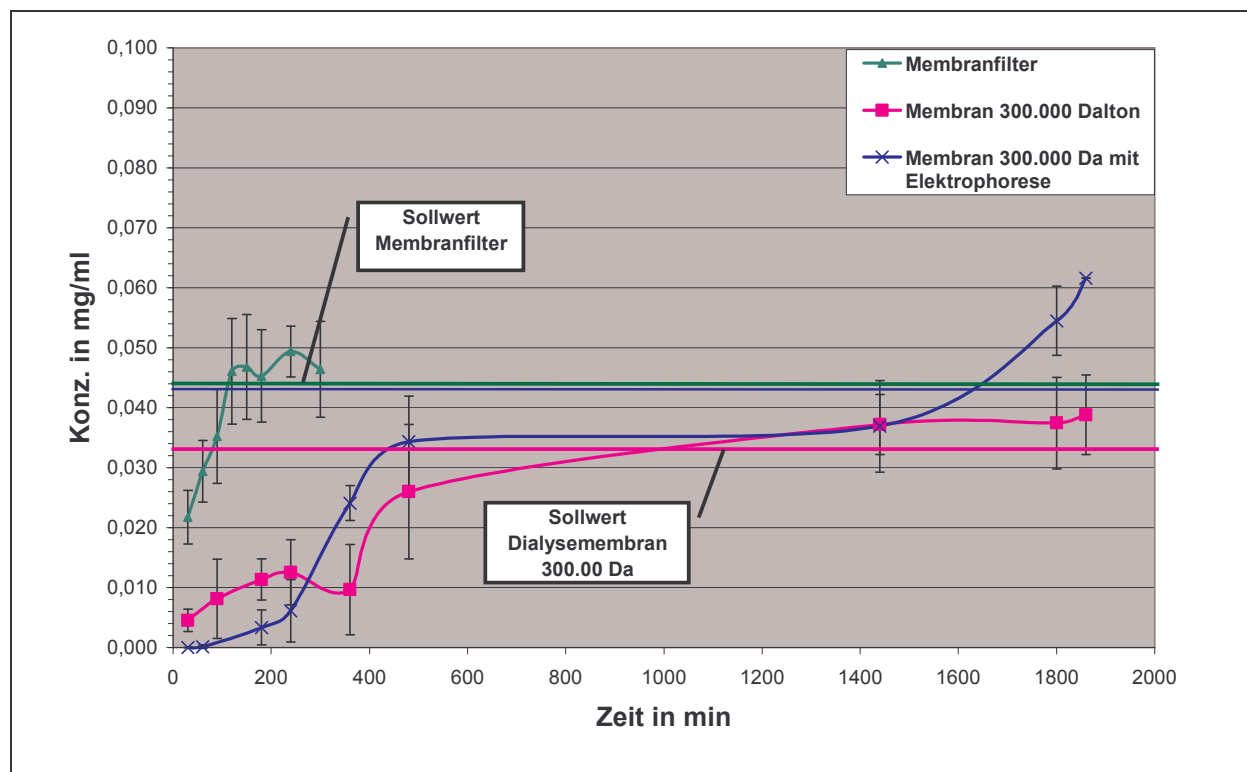


Abb. 60: Einfluss der Trennmembran auf Lysozymverteilung zwischen Donator-und Akzeptormedium einer Franzzelle(n=6)

In den durchgeführten Testreihen erwies sich der Einsatz einer modifizierten Franzzelle als ideales System für die Untersuchungen.

Dabei zeigt die Abbildung 60 den Vergleich zwischen der ermittelten Verzögerungen in der Proteinverteilung im Gesamtpuffer durch die getesteten Membranen. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Dialysemembran die Verteilung von Lysozym im Puffersystem erheblich verlangsamt. In der Abbildung ist zu erkennen, dass sich erst nach ca. 24 h das dem Donatormedium zugesetzte Lysozym gleichmäßig über das gesamte System verteilt hat.

Durch die Verwendung eines Membranfilters mit einer durchschnittlichen Porengröße von 0,2 µm konnte die Verzögerung der Lysozymverteilung im Gesamtsystem reduziert werden, so dass nach ca. drei Stunden eine gleichmäßige Verteilung des Proteins im Gesamtsystem erreicht wurde (siehe Abb. 60).

Im Rahmen der Voruntersuchungen wurden auch unterschiedliche Methoden für den Nachweis des freigesetzten Lysozyms getestet. Anfänglich wurde mit einem unspezifischen Proteinnachweis nach Bradford gearbeitet. Es zeigte sich jedoch bald, dass die hiermit erreichten Nachweisgrenzen von ca. 50 µg/ml nicht für die Quantifizierung des abgegebenen Proteins ausreichten, welche im Bereich von ungefähr 0,5 -2 µg/ml liegen sollten. Gleichzeitig fehlte dieser Nachweismethode eine ausreichende Selektivität für Lysozym. Zur Verbesserung der Selektivität wurde dieses Verfahren mit einem Elektrophoreseschritt gekoppelt. Hiermit konnte das nachgewiesene Protein eingegrenzt und gleichzeitig die Nachweisgrenze reduziert werden. Da mit dieser Methode jedoch nur noch ein halbquantitativer Nachweis des Lysozyms möglich ist, wurde als Alternative ein ELISA- Test für die Quantifizierung eingesetzt. Es handelt sich bei dem verwendeten Test um ein Direktcoating, d.h. die in der Probe enthaltenen Proteine werden direkt an die Platte gebunden und anschließend mittels Antigen-Antikörperreaktion und einer gekoppelten Farbreaktion detektiert. Nachteil dieser Methode ist, dass in der Probe enthaltenes Fremdprotein ebenfalls an der Platte bindet und so das nachzuweisende Lysozym weniger Bindungsstellen hat und dadurch die Möglichkeit besteht, dass weniger Lysozym nachgewiesen wird als vorhanden ist. Die Umstellung auf einen Sandwich-ELISA konnte aufgrund eines engen Zeitplans nicht mehr realisiert werden. Es wird daher für nachfolgende Arbeiten diese Umstellung empfohlen.

4.4.2 Freisetungsverhalten von Hydroxyethylstärkemikropartikeln

Abschließend erfolgten erste Freisetzungsuntersuchungen aus den neu entwickelten Hydroxyethylstärkemikropartikeln. Diese Untersuchungen dienten dazu, einen Anhaltspunkt für eine eventuelle verzögerte Abgabe von Protein aus den Hydrogelpartikeln zu erhalten. Dazu wurde einem Zweiphasensystem aus HES-HEMA, PEG und einem wässrigen 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0 eine definierte Menge Lysozym zugesetzt. Diese Mischung

wurde unter Zusatz des Photoinitiators Irgacure mittels Photopolymerisation zur Herstellung der proteinbeladenen Mikropartikel verwendet. Mit Hilfe eines Polymerisationsansatzes konnten ca. 70 bis 100 mg aufgereinigte proteinbeladene Partikel hergestellt werden. Aus einer solchen Charge wurden mehrere Franzzellen mit jeweils ca. 20 mg Mikropartikel beladen und untersucht.

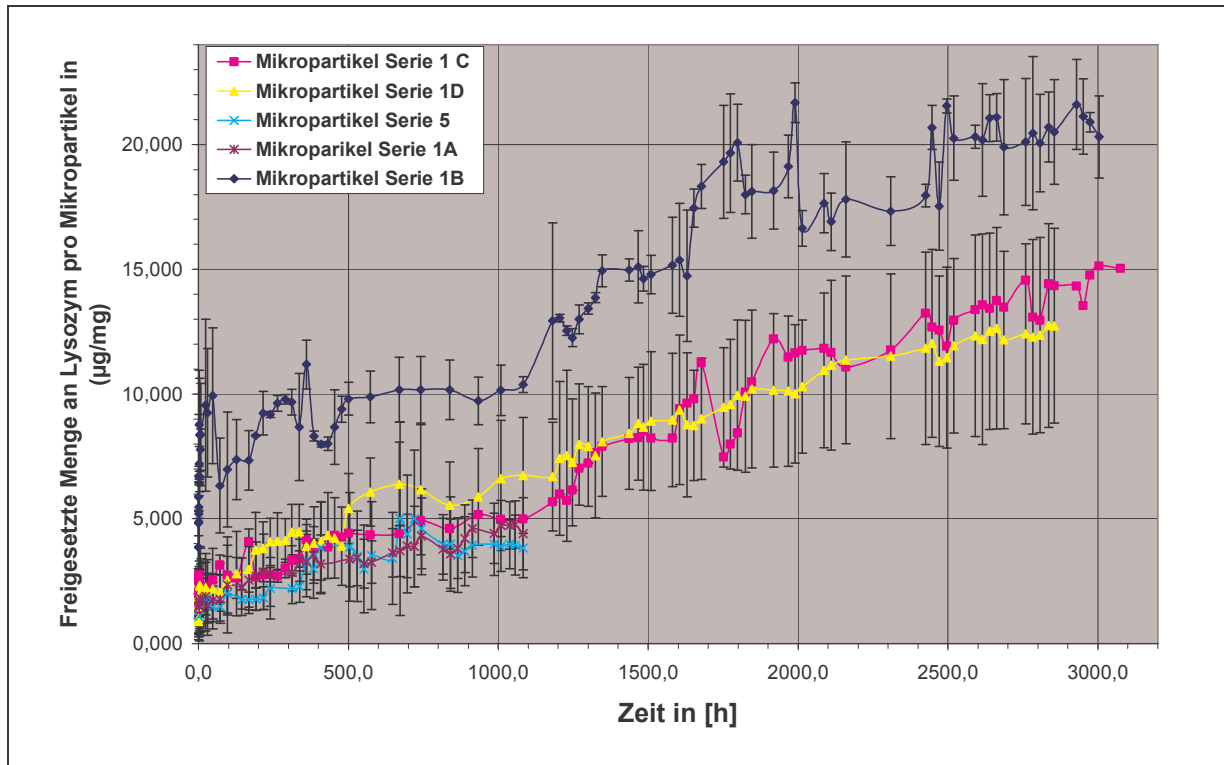


Abb. 61: Freigesetzte Lysozymmenge in μg pro Mikropartikel in mg ($n=4$)

In Abbildung 61 ist die während eines Zeitraums von 4 Monaten kumulativ freigesetzte Lysozymmenge anhand der eingesetzten Chargen dargestellt. Die untersuchten Mikropartikelchargen unterscheiden sich in der für die Proteinbeladung eingesetzten Lysozymmenge. Die Serie 1C enthielt im Gesamtsystem 19 mg/ml Lysozym, Serie 1D 17,7 mg/ml, Serie 5 22,3 mg/ml und 1A 100 mg/ml.

Die erhaltenen Freisetzungskurven zeigen einen ähnlichen Verlauf, trotz der unterschiedlichen Mengen an eingesetztem Lysozym. Dabei zeigen diese Freisetzungsuntersuchungen eine unerwartet langsame Abgabe des Proteins aus den entwickelten Mikropartikeln. Nach dem Beobachtungszeitraum von 4 Monaten waren mikroskopisch an den verwendeten Partikeln keine sichtbaren Hinweise auf Degradationsvorgänge feststellbar.

In den Freisetzungsversuchen weisen alle polymerisierten HES-HEMA-Partikel nahezu die gleichen freigesetzten Lysozymmengen auf (siehe Abb. 61). Die einzige Ausnahme bilden die hergestellten Mikropartikel der Serie 1B. Hier wurde der Polymerisationsansatz mit Lysozym übersättigt, d.h. es kam zu einer Bodensatzbildung. Dabei ist für dieses System festzustellen, dass in der Anfangsphase der Freisetzungsuntersuchungen sehr viel mehr

Lysozym freigesetzt wird als bei den anderen untersuchten Proben. Die anfänglich höheren Mengen an freigesetzten Lysozym lassen sich durch eine vermehrte Einlagerung von Protein in die während der Polymerisation entstehenden Hohlräume der Mikropartikel erklären. Während der Freisetzung werden diese Hohlräume mit Wasser angereichert und ermöglichen den Stofftransport aus dem Partikel. Daneben ist es zusätzlich möglich, dass ein Teil des verwendeten Lysozyms an der Oberfläche der Mikropartikel adsorbiert ist, da nach dem Polymerisationsprozess die gebildeten Partikel in der wässrigen PEG-Protein-Suspension sedimentieren und ebenfalls einen Bodensatz bilden. An dieser Stelle besteht die Möglichkeit, dass es zu Wechselwirkungen mit dem überschüssig verwendeten Lysozym kommt. Es wird von einem Adsorptionsprozess des Proteins ausgegangen. Da die Proben nach der Polymerisation während des Aufarbeitungsprozess gewaschen wurden, ist die Freisetzung von Lysozym jedoch nur denkbar, wenn der Desorptionsprozess des Proteins länger dauert als der verwendete Waschprozess von ca. 1 Stunde. Kommen die Mikropartikel wieder in Lösung für die Freisetzungsuntersuchungen, erfolgt innerhalb der ersten 3 Stunden eine Abgabe von Lysozym, bei welchem es sich um desorbiertes Lysozym handeln könnte oder um Protein, welches aus den festgestellten Hohlräumen freigesetzt wird. Im Anschluss an diesen Vorgang erfolgt nach und nach die weitere Proteinfreisetzung aus dem quellenden Mikropartikel. Da für die untersuchten Mikropartikel nach Abbruch der Freisetzungsuntersuchungen keine äußerlichen Veränderung durch Erosion oder Degradation ermittelbar waren, ist nicht klar, ob Lysozym neben der Diffusion aus den ermittelten Hohlräumen im Hydrogel auch aus dem Hydrogelnetzwerk freigesetzt wurde. Aus den erhaltenen Daten lässt sich daher noch nicht ableiten, ob es zu einer kontinuierlichen Proteinfreisetzung über Diffusion kommt, welche möglicherweise überlagert wird von freigesetztem Protein aus dem Abbau der Hydroxyethylstärkepartikel.

Die Untersuchungen zeigen, dass die entwickelten Hydrogelmikropartikel in der Lage sind, Lysozym stark verzögert abzugeben.

4.5 Fazit

In den durchgeführten Untersuchungen wurde ein neues Zweiphasensystem auf der Basis von Hydroxyethylstärke (HES) und Polyethylenglykol (PEG) entdeckt. Für dieses System konnte gezeigt werden, dass die Zweiphasenbildung von vielen verschiedenen Faktoren abhängt. So konnte festgestellt werden, dass die Molekülgröße des PEGs einen erheblich größeren Einfluss auf die Lage der Phasengrenze dieses Zweiphasensystems hat als die Molekülgröße der verwendeten HES. Dies wurde begründet mit der sich durch die Zunahme der Kettenlänge stark verändernden Polarität des PEG-Moleküls. Dagegen beeinflusste die HES das Zweiphasensystem stärker durch den verwendeten Substitutionsgrad. Auch hier konnte dieser Effekt über die Veränderung der Hydrophilie der HES durch die Anzahl der eingefügten Gruppen erklärt werden. In Folge dessen kommt es durch die Angleichung der

hydrophilen bzw. hydrophoben Eigenschaften von PEG und HES zu weniger Wechselwirkungen zwischen den Molekülen und damit zu einer erschwerten Separation. Neben diesen Interaktionsmöglichkeiten wurde untersucht, inwieweit über die Lösungsstrukturen der verwendeten Polymere die Möglichkeit besteht, die Wechselwirkungen, welche zur Phasenseparation führen, näher zu erläutern. Dabei wurde für PEG die Form eines teilweise gestreckten Polymerknäuels ermittelt. Diese Struktur ermöglicht die Interaktion von hydrophilen und hydrophoben Kettenabschnitten des PEGs mit anderen Polymeren wie z.B. der HES, welche die Form eines halbflexiblen Stäbchens in wässrigem Medium annimmt. Über diese Struktur ist HES in der Lage, hauptsächlich hydrophile Wechselwirkungen mit dem umgebenen Milieu einzugehen und erklärt somit den festgestellten geringen Einfluss von HES auf die Lage der Phasengrenze.

Für die spätere Anwendung des entwickelten Zweiphasensystems für die Herstellung von Mikropartikeln über einen Polymerisationsschritt in einer W/W-Emulsion wurden weitere Parameter wie die Phasenseparationszeit, Phasenmengenverhältnisse und Wassergehalte untersucht. Des Weiteren erfolgten Untersuchungen zum Separationsverhalten von Proteinen und Salzen im Separationssystem aus PEG, HES und Wasser. Die Untersuchungen der Separationseigenschaften von Lysozym dienten dazu, Mechanismen für die Steuerung der Proteinanreicherung in der HES-Phase zu finden. Dies war von entscheidender Bedeutung für die Herstellung von proteinbeladenen Mikropartikeln über das Zweiphasensystem. Es wurde dabei festgestellt, dass sich unter dem Einfluss von Salzen die Proteine in der HES oder PEG-Phase anreichern lassen. Dabei wird eine Anreicherung von Lysozym und BMP-2 in der HES-Phase durch stabilisierende Salze der Hofmeister-Serie in niedrigen Konzentrationen (20 mM) begünstigt, bei gleichzeitiger Einstellung des pH-Wertes im neutralen Bereich oder im Bereich des isoelektrischen Punktes des verwendeten Proteins. Die Einflüsse der Salze werden dabei von der Separation der Salze im Zweiphasensystem beeinflusst. So wurde festgestellt, dass die eingesetzten Salze im System heterogen separieren und gleichzeitig auch die Verteilung des Wassers verändern. Dabei kann man davon ausgehen, dass es durch die Salze zu einer Beeinflussung der Wasserstrukturierung und der Polymerstrukturierung kommt und damit auch die möglichen Wechselwirkungen mit zugesetzten Polymeren beeinflusst wird.

Für die Herstellung von Mikropartikeln mit Hilfe des entwickelten Zweiphasensystems war es notwendig, für die Polymerisation die disperse innere HES-reiche Phase zu derivatisieren. Dazu erfolgte eine chemische Verknüpfung der HES über eine Carbonylesterfunktion mit einer Hydroxyethylmethacrylatgruppe. Diese derivatisierte Stärke konnte dann in einer Photopolymerisation zu proteinbeladenen Mikropartikeln umgesetzt werden. Dabei wurde für diese Partikel eine begrenzte Quellung nachgewiesen, so dass davon auszugehen ist, dass der Hydrogelcharakter der HES durch die Derivatisierung und die Polymerisation nicht

verloren ging. Es konnte für diese neuen mikropartikulären Strukturen in weiteren Untersuchungen gezeigt werden, dass sich im Partikelinneren neben dem Hydrogelgerüst Hohlräume bilden. Dabei ist die Einlagerung von Lysozym in beide Bereiche denkbar. Für die Klärung der Proteineinlagerung im Mikropartikel sind weitere Untersuchungen in diesem Bereich notwendig. Dabei sollte auch geklärt werden, welche Prozesse zur Bildung der Hohlräume im Mikropartikel führen.

Für proteinbeladene Partikel wurden erste Freisetzungsuntersuchungen durchgeführt, in denen eine unerwartet lange Abgabe von Protein nachgewiesen wurde. Dabei ist aus den ermittelten Daten nicht möglich zu klären, in welcher Form die Proteinfreisetzung erfolgt. Die Proteinfreisetzung kann sowohl durch Desorptionsvorgänge des Proteins von der Partikeloberfläche, durch Diffusion des Wirkstoffes aus dem gequollenen Mikropartikel und durch Degradationsvorgänge der Polymermatrix erklärt werden. Daher ist es notwendig, in weiteren Versuchen zu klären, in welcher Form die Freisetzung erfolgt. Des Weiteren sollte analysiert werden, ob sich die Proteinfreisetzung durch die Verwendung von unterschiedlich substituierten Hydroxyethylstärkederivaten beeinflussen lässt.

5. Zusammenfassung

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die Entwicklung eines Hydrogel Drug Delivery Systems auf der Basis von Hydroxyethylstärke (HES). Es konnte ein neues mikropartikuläres System entwickelt werden, welches sich aufgrund der verwendeten Herstellungsmethoden für die Verarbeitung und Applikation von arzneilich wirksamen Proteinen eignet. Die Herstellung der Hydroxyethylstärkepartikel nutzte ein wässriges Zweiphasensystem, welches entsteht durch das Mischen von zwei wässrigen Polymerlösungen. Wird ein solches Zweiphasensystem gemischt, entsteht eine Wasser-in-Wasser-Emulsion (W/W). Enthält die disperse Phase der W/W-Emulsion eine polymerisierbare Verbindung, so ist es möglich, den Emulsionsschritt für die Herstellung von mikropartikulären Strukturen zu nutzen. Verwendung fanden dabei die Polymere Hydroxyethylstärke (HES) und Polyethylenglykol (PEG), auf deren Basis ein neues Zweiphasensystem entwickelt wurde.

Für dieses Zweiphasensystem wurden charakteristische Eigenschaften, wie die Phasengrenze oder die Konodenlage ermittelt. Des Weiteren wurden im Bezug auf die geplante Verwendung als Herstellungssystem für Hydrogel-Stärke-Partikel verschiedene Separationseigenschaften ermittelt. Dazu gehörten die Phasenseparationszeit, die Phasenmengenverhältnisse und die Wasserverteilung im System. Für diese Untersuchungen wurden verschiedene HES analysiert, welche alle in der Praxis als Plasmaexpander Anwendung finden. Diese Auswahl an untersuchten Stärken wurde für anschließende Versuchsreihen auf HES 200/0,5 eingeschränkt.

Für die geplante Polymerisation im wässrigen Zweiphasensystem erfolgte anschließend in einer Synthese die chemische Derivatisierung der HES 200/0,5. Dazu wurde über eine Esterbrücke eine polymerisierbare Hydroxyethylmethacrylatfunktion in das Gerüst der HES eingebaut. Das entstandene Produkt dieser Derivatisierung zeigte weiterhin Phasenseparation in Verbindung mit PEG, wies jedoch eine schlechtere Löslichkeit in Wasser auf. Die erhaltene modifizierte HES zeigte jedoch im Zusammenhang mit PEG weiterhin Phasenseparation und konnte so für die Herstellung von chemisch vernetzten Hydroxyethylstärkemikropartikeln verwendet werden.

Produziert wurden die Hydroxyethylstärkemikropartikeln in einem zweiphasigen System aus derivatisierter Stärke, Polyethylenglykol und Wasser beziehungsweise Proteinpuffer.

Um eine Anreicherung des verwendeten Proteins in der zu polymerisierenden HES-Phase zu steuern, wurden verschiedene Untersuchungen zum Separationsverhalten von Proteinen durchgeführt. Dabei wurde hauptsächlich Lysozym verwendet. Das Lysozym diente als ein Modellprotein für das Verhalten von kleinen Proteinen im wässrigen Zweiphasensystem. Unter Verwendung von Bone morphogenetic Protein-2 (BMP-2) wurden die erhaltenen Ergebnisse überprüft. Es wurde untersucht, in wieweit sich die Anreicherung des Proteins in

einer der beiden Phasen des Zweiphasensystems steuern lässt. Dabei ist festzustellen, dass die Verwendung von stabilisierenden Salzen der Hofmeister-Serie in niedrigen Konzentrationen die Anreicherung des Proteins in der Stärkephase des Zweiphasensystems verbessert. Außerdem konnte auch ein großer Einfluss des verwendeten pH-Werts auf die Separation der Proteine ermittelt werden.

Parallel dazu erfolgten Untersuchungen zum Separationsverhalten von Salzen im wässrigen Zweiphasensystem, um zu analysieren, ob sich das Zweiphasensystem durch den Zusatz von Salzen verändert. Dabei zeigte sich, dass sich die eingesetzten Salze unterschiedlich im Zweiphasensystem anreichern. Dabei beeinflusst die heterogene Salzverteilung nicht nur die Proteinanreicherung im System, sondern auch die Wasserverteilung. Des Weiteren kommt es durch den Salzzusatz zu erheblichen Veränderungen in der Dichte und Viskosität der separierenden Phasen, welche sich nicht allein durch die Umverteilung des Wassers erklären lassen. Im Zusammenhang mit diesen Ergebnissen wurden verschiedene Thesen bezüglich der an der Entstehung eines wässrigen Zweiphasensystems aus PEG und Hydroxyethylstärke beteiligten Größen entwickelt. Studiert wurden die Interaktionsmöglichkeiten zwischen den Polymeren, sowie auch das Lösungsmittel Wasser selbst und dessen Einfluss auf die Struktur der Polymere in Lösung.

Für die Herstellung von Mikropartikeln wurden die Ergebnisse aus den verschiedenen Untersuchungen verwendet, um ein neu entwickeltes Photopolymerisationsverfahren zu optimieren. Mit diesem neuen Verfahren war es möglich, auf schonende Weise Mikropartikel aus dem Hydroxyethylstärkederivat herzustellen. Gleichzeitig konnten durch den Ersatz von Wasser durch Protein-Pufferlösung die hergestellten Mikropartikel während des Polymerisationsschrittes mit Protein zu beladen werden. Die Produkte der Polymerisation wurden unter Verwendung von mikroskopischen Verfahren und der Bestimmung von Partikelgrößenverteilungen charakterisiert. Dabei wurden über die ermittelten Partikelgrößenverteilungen weitere Optimierungen des Mikropartikelherstellungsverfahrens durchgeführt, um möglichst eng verteilte Partikelgrößen im Bereich von 1-50 μm zu erhalten. Die Mikropartikel mit inkorporiertem Protein wurden auf ihre Freisetzungseigenschaften untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass das eingeschlossene Protein zeitlich stark verzögert aus den Mikropartikeln freigesetzt wird.

Diese Arbeit zeigt einen Weg, auf der Basis von Hydroxyethylstärke ein Drug Delivery System zu entwickeln für die Freisetzung von Proteinen. Dabei wird gezeigt, dass eine Reihe verschiedener Größen, von den verwendeten Ausgangsstoffen und deren Charakteristika bis hin zum verwendeten Herstellungsverfahren und dessen Eigenschaften für die Entwicklung berücksichtigt werden müssen.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Albersson, Per-Ake, "Partition of Cell Particles and Macromolecules" John Wiley & Sons, Inc (1986).
- [2] Franssen, O., „A novel method for polymeric microparticles without the use of organic solvents“, *ijpharm* 168, (1998), 1-7.
- [3] Hennink, W.E., "Novel crosslinking methods to design hydrogels", *Advanced Drug Delivery Reviews* 54, (2002), 13-36.
- [4] Stenekes, R. J. H., "The preparation of Dextran Microspheres in an all-aqueous system: Effect of the formulation parameters on the particle characteristics", *Pharmaceutical Research* 15, (1998) 4.
- [5] Bos, G.W., "Hydrogels for the controlled release of pharmaceutical proteins", *Biopharm Europe*, (November 2001).
- [6] Hennink, W.E., "Molecular design of degradable dextran hydrogels for the controlled release of proteins", *Biomedical polymers and polymer therapeutics*, New York (2001), 3-18.
- [7] Bungenberg de Jong, H.G., "Biocolloids and their interactions", Wien, Springer, (1956).
- [8] Hoffmann, A. S., "Hydrogels for biomedical applications", *Advanced Drug Delivery Reviews* 43, (2002), 3-12.
- [9] De Groot, C. J., "In vivo biocompatibility of biodegradable dextran- based hydrogels tested with human fibroblasts", *Biomaterials* 22, (2001), 1197-1203.
- [10] Fournier, C., "Preparation and preclinical evaluation of bioresorbable hydroxyethylstarch microspheres for transient arterial embolization", *International Journal of pharmaceutics*, 106 (1994), 41-49.
- [11] Fresenius Kabi AG, „Produktinformation und Physikochemisches Profil HES“, (2001).
- [12] Van Dijk-Wolthuis, W.N.E., „Synthesis, characterization and polymerization of glycidylmethacrylate derivatized dextran“, *Macromolekules* 28, (1995), 6317-6322.

-
- [13] Van Dijk-Wolthuis, W.N.E., "A new class of polymerizable dextrans with hydrolyzable groups: hydroxyethylmethacrylated dextran with and without oligolactate spacer", *Polymer* 38, (1997) 25, 6235-6242.
- [14] Tuinier, R., "Depletion- induced phase separation in colloid- polymer mixtures", *Advanced in Colloid and Interface Science*, 103 (2003), 1-31.
- [15] Flory, P.J., "Principles of polymer chemistry", Ithaca, Cornell Univ. Press, (1953).
- [16] Huggins, M.L., "Physical chemistry of high polymers", New York, Wiley, (1958).
- [17] Kulkarni, A. M., "Effects of polymer density fluctuations on depletion interaction", *J. Phys.: Condens. Matter*, 12 (2000), A 302- A 307.
- [18] Striolo, A., "The depletion attraction between pairs of colloid particles in polymer solution", *Molecular Stimulation*, Vol. 30 (2004), 437-449.
- [19] Vrij, A., "Polymers at interfaces and interactions in colloidal dispersions", *Pure & Appl. Chem.*, Vol 48 (1976), 471-483.
- [20] De Bont, P., "Phase separation in milk protein and amylopectin mixtures", *Food Hydrocolloids*, 16 (2002), 127-138.
- [21] Aqueous biphasic system, <http://www.lsbu.ac.uk/water/biphasic.html>.
- [22] Bauer, K.H., "Lehrbuch der pharmazeutischen Technologie", Stuttgart, 7 Auflage (2002), 63-64.
- [23] Chaplin, M.F., "Water: its importance to life", *Biochemistry and Molecular Biology Education* 29, (2001), 54-59.
- [24] The structure of liquid water, <http://www.lsbu.ac.uk/water/cluster.html>.
- [25] Chaplin, M.F., "A proposal for the structuring of water", *Biophysical chemistry* 83, (1999), 211-221.
- [26] The Hofmeister Series, <http://www.lsbu.ac.uk/water/hofmeist.html>.
- [27] Modig, K., "Dynamics of protein and peptide hydration", *J. AM. Chem. Soc.*, 126 (2004), 102-114.
- [28] Karlson, P., "Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler", 14 Auflage (1993), 23-36.

-
- [29] Chaplin, M.F., Protein hydration, <http://www.lsbu.ac.uk/water/protein.html>.
- [30] Guttzeit, Y., „Volumenänderungen bei der Faltung von HEW-Lysozym: Korrelation mit CD-spektroskopischen Daten und energetischen Parametern“, Dissertation (2002).
- [31] Bellissent-Funel, M. C., “Hydration on protein dynamics and function”, J. Mol. Liquids, 84 (2000), 39-52.
- [32] Hofmeister, F., “Zur Lehre von der Wirkung der Salze“, Arch. Exp. Pathol. Pharmacol., Leipzig (1888), 247-260.
- [33] Green, A. A., „The solubility of hemoglobin in solutions of chlorides and sulfates of varying concentrations“, J. Biol. Chem., (1932), 47-66.
- [34] Boström, M., “Specific Ion Effects: Why the properties of lysozym in salt solutions follow a hofmeister series”, Biophysical Journal, 85 (2003), 686-694.
- [35] Boström, M., “Influence of the hofmeister effects on surface pH and binding of peptides to membranes”, Langmuir, 18 (2002), 8609-8615.
- [36] Curtis, R.A., “Protein– protein and protein- salt interactions in aqueous protein solutions containing concentrated electrolytes”, Biotechnology & bioengineering, 57 (1962), 11-21.
- [37] Rajamani, S., “Size dependent hydration, its asymmetry and convergence to macroscopic behavior”, Journal of Chemical Physics, 120 (2004), 1-32.
- [38] Feig, M., “Modeling high- resolution hydration patterns in correlation with DNA sequence and conformation“, J. Mol. Biol. (1999), 286, 1075-1095.
- [39] Warner, D. T., “Some possible relationships of carbohydrates and other biological components with the water structur at 37°“, Nature (1962), 196, 1055- 1058.
- [40] Asnejo, J. A., “Phase separation rates of aqueous two- phase systems: correlation with system properties”, Biotechnology & bioengineering, 79:2 (2002), 217-223.
- [41] Johansson, G., “Effects of salts on the partition of proteins in aqueous polymeric biphasic systems”, Acta chemica Scandinavica, B 28 (1974), 873-882.
- [42] Hey, M., “The salting- out effect and phase separation in aqueous solutions of electrolytes and polyethylenglycol”, Polymer, 46 (2005), 2567-2572.

-
- [43] Boström, M., "Specific Ion Effects: Why DLVO Theory Fails for Biology and Colloid Systems", Physical Review Letters 87, (2001) 16, 1681031- 1681034.
- [44] Bloustine, J., "Light Scattering and Phase Behavior of Lysozyme-Poly(EthylenGlycol) Mixtures", Physical Review Letters 96, (2006), 087803 1-4.
- [45] Hunnius, "Pharmazeutisches Wörterbuch", 8. Auflage, New York (1998).
- [46] Brunner, B.M., "Untersuchungen zur inneren Struktur von Hydrogelen aus N-Isopropylacrylamid mittels statischer Lichtstreuung", Dissertation Stuttgart (2005).
- [47] Albinsky, K., "Photopolymerisation von 2-Hydroxyethylmethacrylat in protischen Lösungsmitteln; Struktur-Eigenschaftsbeziehungen der Methyacrylat –Netzwerke", Edition Wissenschaft: Reihe Chemie: Bd 160 Halle-Wittenberg, Univ., Diss., (1997).
- [48] Franssen, O., "Controlled release of a model protein from enzymatically degrading dextran microspheres", Journal of controlled release 59, (1999), 219-228.
- [49] Wichterle, O., "Hydrophilic gels in biologic use", Nature 185, (1960), 117.
- [50] Elversson, J., „Aqueous two-phase systems as a formulation concept for spray-dried protein", ijpharm 294, (2005), 73-87.
- [51] Kissel, T., "Nanosized cationic hydrogels for the drug delivery: preparation, properties and interactions with cells", Advanced Drug delivery Reviews, 54 (2002), 99-134.
- [52] Müller, R.H., "Pharmazeutische Technologie Moderne Arzneiformen", Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart (1998).
- [53] Venâncio, A., "Evaluation of Crude Hydroxypropyl Starch as a Bioseparation Aqueous- Phase- Forming Polymer", Biotechnology progress 6, (1993), 635-639.
- [54] Tjerneld, F., "New aqueous two-phase system based on hydroxypropyl starch useful in enzyme purification" Enzyme Microb. Technol. 8, (1986), 417-423.
- [55] Sarubbo, L.A., "New aqueous two-phase system based ion cashew-nut tree gum and poly(ethylene glycol)", J. Chromatogr.B 743, (2000), 79-84.
- [56] Sommermeyer, K., "Characterisation of polymers by size exclusion chromatography using multiple detections. Investigation on the determination of structural differences of hydroxyethylstarches", Chromatographia 33, (1992) 3-4, 151-153.
- [57] Enzymdatenbank, <http://brenda.bc.uni-koeln.de>.

-
- [58] Kübler, N.R., "Osteoinduktion: Ein Beispiel für die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen durch Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)", <http://www.uni-duesseldorf.de/HHU/Jahrbuch/2002/Kuebler/>.
- [59] Kübler, N.R., "Inductive properties of recombinant human BMP-2 produced in a bacterial expression system", *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, 27 (1998), 305-309.
- [60] Vallejo, L.F., "Renaturation and purification of bone morphogenetic protein-2 produced as inclusion bodies in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*" *Journal of Biotechnology* 94, (2004), 185-194.
- [61] Maire, M., "Bovine BMP osteoinductive potential enhanced by functionalized dextran-derived hydrogels", *Biomaterials*, 26 (2005) 5085-5092.
- [62] Yamamoto, M., "Controlled release by biodegradable hydrogels enhances the ectopic bone formation of bone morphogenetic protein", *Biomaterials*, 24 (2003), 4375-4383.
- [63] Oliczewski, S., "A novel Fiber-Optic Photometer for IN-Situ Stability Assessment of Concentrated oil-in-water emulsions", *JAAPS*, (2007).
- [64] Skoog, B., "Determination of Polyethylene Glycols 4000 and 6000 in Plasma Protein Preparations", *Vox Sang.* 37: 345-349 (1979).
- [65] <http://www.sbu.ac.uk/biology/enztech/starch.html> „The Use of enzymes in starch hydrolysis“.
- [66] Stefanova, M.E., Schwerdtfeger, R., „Heat-stable pullulanase from *Bacillus acidopullulyticus*: characterisation and refolding after guanidinium chloride-induced unfolding", *Extremophiles*, (1999) 3, 147-152.
- [67] Hester, R., "Molecular Weight determination By Dilute Solution Viscosity Measurements", <http://www.psrc.usm.edu/macrog/lab/dsvh.htm>, (2001).
- [68] Beister, J., "Bestimmung von Molmassen, Teilchengrößen und deren Verteilungen an hydrophob und hydrophil modifizierten Cellulosederivaten", *Dissertation Hamburg*, (2001).
- [69] <http://zeus.plmsc.psu.edu/~manias/Mat96443/chapter10-2.pdf>.
- [70] Chuah, H.H., "Poly(trimethylene terephthalate) molecular weight and Mark-Houwink equation", *Polymer*, 42 (2001), 7137-7139.

- [71] Schuchard, M., "ProteoSilverTM: High Sensitivity Silver Stain for SDS-PAGE", Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA (2002).
- [72] Gottlieb, H.E., "NMR Chemical Shifts of common laboratory solvents as Trace Impurities", J.Org. Chem. 62, (1997) 21, 7514.
- [73] Müller, R.H., „Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis“, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH (1996), Stuttgart.
- [74] Bunjes, H., "Tensidfreie Multiple Emulsionen als Drug Delivery Systeme-Entwicklung, Herstellung und Charakterisierung", In Muschiolik G., Bunjes H. (Hrsg.) Multiple Emulsionen- Herstellung und Eigenschaften. Behr's Verlag, Hamburg (2007).
- [75] Winckler, J., "Vitalfärbung von Lysosomen und anderen Zellorganellen der Ratte mit Neutralrot", Prog. Histochem. Cytochem. 6,3, (1974).
- [76] Viswanathan, A., "Effect of degree of substitution of octenylsuccinate starch on enzymatic degradation", Journal of environmental polymer degradation 7, (1999) 4.
- [77] Ukai, S., "Gas-liquid chromatography of acid hydrolysates of hydroxyethylstarch and hydroxyethylcellulose", Journal of Chromatography, 435 (1988), 374-379.
- [78] Stephens, D., "Determination of amylose/pariculate relationship in hydroxyethylstarch", PDA Journal of pharmaceutical Science & Technology, 53 (1999) 4, 181-185.
- [79] Thevis, M., "Nachweis des Plasmavolumenexpanders Hydroxyethylstärke in Humanurin", Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin, Jahrgang 52, Nr. 11 (2001) 316-320.
- [80] Shaffer, C.B., "Solid poylethylene glycols (carbowax compounds)-quatitative determination in biological materials", Analytical chemistry 19, (1947) 1.
- [81] Shaffer, C.B., "The absorption and excertion of the solid polyethylene glycols ("Carbowax" Compounds), Journal od the american pharmaceutical association, (1947), 152-157.
- [82] Mohazzeb, S. , „Amylose, Amylopektin, Glykogen, β -Dextrine Molekulargewichte, Iodbeladung, Computergestützte Strukturaufzeichnungen“, Dissertation (1988) Hamburg.

-
- [83] Rendleman, J.A., „Hydrolytic action of α -amylase on high-amylose starch of low molecular mass”, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, (2000) 31, 171-178.
- [84] Wang, N. S., “Starch hydrolysis by amylase” department of chemical Engineering University of Maryland, <http://www.glue.umd.edu/~nsw/ench485/lab5.htm>.
- [85] Sommermeyer, K, “Neue Entwicklungen zur physikalisch-chemischen Charakterisierung von HES”, Tagungsbeitrag.
- [86] Srinivasan, C., “Effect of the additives on encapsulation efficiency, stability and bioactivity of entrapped lysozyme from biodegradable polymer particles”, *Journal of Microencapsulation* 22, (2005) 2, 127-138.
- [87] Voigt, R., “Pharmazeutische Technologie für Studium und Beruf“, 8. Auflage (1995), Berlin- Wiesbaden, Ullstein Mosby.
- [88] Reichl, F.X., „Toxicokinetic of HEMA in guinea pigs“, *Journal of Dentistry* 30 (2002) 353-358.
- [89] Cadée, J.A., “In vivo Biocompatibilität of Dextran –Based Hydrogels“, *Journal of biomedical materials research*, Band 50, 3 (2000), 397-404.
- [90] Elisseeff, J., “Transdermal Photopolymerisation of Poly(ethylene Oxide)- Based Injectable Hydrogels for Tissue-Engineered Cartilage“, *Plastic and Reconstructive surgery*, Band 104, 4 (1999), 1014-1022.
- [91] Nguyen, K.T., “Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications”, *Biomaterials*, 23 (2002), 4307-4314.
- [92] Dong, H., Appendix A “Synthesis of water- soluble polymers via the UV- Photopolymerization”, PhD work Drexel University, April 24, 2001, 242-270.
- [93] Ciba, “Ciba® IRGACURE® 2959 Photoinitiator- Produktinformation”, Ciba Speciality Chemicals Inc., (1999), Basle.
- [94] Bryant, J. St., “Cytocompatibility of UV and visible light photoinitiating systems on cultured NIH/3T3 fibroblasts in vitro”, *J. Biomater: Sci. Polymer Edn.* Vol. 11, No. 5. (2000) 439-457.
- [95] Crommelin, D. J. A., “Nanotechnological approaches for the delivery of macromolecules”, *Journal of Controlled Release* 87, (2003), 81-88.

-
- [96] McGee, J.P., "Zero order release of protein from poly (D,L-lactide-co-glycolide) microparticles prepared using a modified phase separation technique", *Journal of Controlled Release* 34, (1995), 77-86.
- [97] Kostanski, W.J., "A Novel In Vitro Release Technique for peptide-Containing Biodegradable Microspheres", *AAPS PharmSciTech* 2000, 1 (2000), article 4.

DIPL. PHARM. KRISTIN SCHEIBE

KERSTENBERG 4, 29413 DIESDORF; GERMANY

NAME	Kristin Scheibe	
GEBURTSDATUM	23.04.1976	
GEBURTSORT	Halberstadt	
FAMILIENSTAND	Ledig	
STAATSANGEHÖRIGKEIT	deutsch	
BILDUNGSGANG	April 2002- Dez. 2005	Technische Universität Braunschweig, Promotion gefördert ab 2004 über die DFG / SFB 578
	02.07.2002	Diplom Pharmazeutin in Kooperation mit der Martin-Luther-Universität Hall- Wittenberg
	17.02.2002	Approbation als Apothekerin
	März 2002	Abschluss der Pharmazeutischen Prüfung, Hannover
	1995-2000	Technische Universität Braunschweig, Studium der Pharmazie
	1991- Juni.1994	Allgemeine Hochschulreife, Magdeburg
BERUFSERFAHRUNG	Jan.1997- März 2000	Tätigkeit als studentische Hilfskraft im Fachbereich für Chemie und Pharmazie
	Sept. 2002-Dez. 2005	Wissenschaftliche Mitarbeiterin; Technische Universität Braunschweig, Institut für pharmazeutische Technologie
	Seit. 2002	Apothekerin in der Hof-Apotheke, Lehrte- Immensen
	Seit Nov. 2005	Apothekerin in der Einhorn-Apotheke, Wittingen-Knesebeck